UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CAMILA DE MATTOS FALEIROS

**Efeito do treinamento físico prévio nas alterações de função
e estrutura renais provocadas pela administração de
adriamicina em ratos**

Ribeirão Preto
2017

CAMILA DE MATTOS FALEIROS

**Efeito do treinamento físico prévio nas alterações de função
e estrutura renais provocadas pela administração de
adriamicina em ratos**

Tese apresentada ao Departamento de
Fisiologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Terezila Machado
Coimbra

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Faleiros, Camila de Mattos

Efeito do treinamento físico prévio nas alterações de função e estrutura renais provocadas pela administração de adriamicina em ratos. Ribeirão Preto, 2017.

115f. : il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Coimbra, Terezila Machado

1. Adriamicina, 2. Angiogênese, 3. Doença renal progressiva, 4. Lesão endotelial, 5. Treinamento físico prévio.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Faleiros, Camila de Mattos.

**Efeito do treinamento físico prévio nas alterações de função e estrutura renais
provocadas pela administração de adriamicina em ratos**

Tese apresentada ao Departamento de
Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Fisiologia

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta obra

Aos meus pais, Eneida e Delcides, pelo amor incondicional, “mão, alma e coração” em todos os momentos que precisei e por sempre acreditarem no meu potencial...

À tia Glória, por acompanhar de perto meu crescimento e estar presente nos momentos bons e difíceis...

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Deus, por sua presença constante durante esta jornada, iluminando o caminho e tornando mais fácil a superação de obstáculos.

À Universidade de São Paulo (USP), em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), pela oportunidade de realização do meu curso de Doutorado.

À Professora Dr^a Terezila Machado Coimbra, por ter permitido o ingresso no Laboratório de Fisiologia Renal, pela orientação, dedicação e apoio durante esta jornada. Obrigada pelo aprendizado.

À Dr^a Heloísa Della Coletta Franscescato, pelo trabalho em conjunto, por auxiliar em todas as etapas do Doutorado, pelas sugestões, “puxões de orelhas”, leituras e releituras...pelo seu apoio e amizade.

Ao Professor Dr Marcelo Papoti, pela colaboração, sugestões de leituras e suporte técnico relacionados ao treinamento físico dos animais.

À Cleonice Giovanini, pelo auxílio prestado no ensino das técnicas desenvolvidas no Laboratório de Fisiologia Renal, imprescindíveis para a realização deste estudo e por dividir as alegrias e tristezas durante estes quatro anos.

Ao aluno de iniciação científica Lucas Chaves, pelo auxílio prestado durante o período de treinamento físico e durante os procedimentos iniciais realizados com os animais.

Ao Lucas Ferreira de Almeida, companheiro de laboratório, por acrescentar conhecimentos, mostrar novas ferramentas na confecção de *slides* e por sempre estar disposto a ajudar.

À Natany Garcia Reis, a mais nova companheira de laboratório, por demonstrar tanta paixão pelo o que faz. É inspirador!

Aos docentes do Departamento de Fisiologia da USP, por contribuírem para minha formação acadêmica e científica.

Aos membros da banca de qualificação, Prof Dr Rubens Fazan Júnior, Prof Dr Fernando Silva Ramalho e Dr^a Tatiane Vilhena Franco, pelas sugestões relevantes para a publicação deste trabalho.

Ao Prof Dr Roberto Silva Costa, pela avaliação dos resultados dos estudos histológicos.

Ao Prof Dr Guilherme de Araújo Lucas, por permitir o uso dos equipamentos do seu laboratório.

Ao Prof Dr Rafael Simone Saia, por me ouvir e pelos conselhos...

Aos colegas do “Cursão de Fisiologia”, pela acolhida...tornamos uma família neste período...

Ao Ricardo Coletti, pelo indispensável auxílio em diversas etapas do Doutorado, sempre disponível quando precisei. Obrigada!

Ao Procópio Cléber Gama de Barcelos Filho, à Aline Barbosa Ribeiro e à Júnia Lara de Deus, por terem a alma gentil, por nossas conversas e pelo apoio constante.

Ao funcionário do Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP, Leonardo Fidélis Filho, pelo cuidado com os animais e pela simpatia.

Aos técnicos do Departamento de Patologia da FMRP, Flávio Henrique Leite e Guilherme de Paula Lemos; e ao técnico do Departamento de Fisiologia da FMRP Rubens Fernando de Melo, pelas inclusões e cortes dos tecidos renais em parafina.

Ao Dr Eduardo Henrique de Lima Umeoka, ao Dr Luiz Eduardo Virgílio da Silva, à Dr^a Simone da Costa Alarcon Arias, à Samira Itana de Souza, à Prof^a Dr^a Iara Augusta Orsi e aos técnicos, Humberto Giusti e à Dr^a Ana Paula Macedo pela inestimável colaboração em diferentes fases do desenvolvimento deste estudo.

À equipe da secretaria do Departamento de Fisiologia da FMRP, Cláudia de Barcellos Vanzela, Elisa Maria Aleixo e Fernando César Rastello, pela atenção, sorrisos durante os atendimentos e colaboração nos assuntos burocráticos.

Ao técnico Clóvis Ferrarezi, pela manutenção dos computadores do Laboratório de Fisiologia renal.

Aos meus pais, pelo incentivo, auxílio em todas as esferas possíveis, pelos conselhos, sabedoria, pelo orgulho que sentem de mim, por me darem a vida...

À tia Glória, por me acolher de braços abertos em sua casa, tornando-a um lar para mim... Por me ouvir e auxiliar todas as vezes que pedi...

Ao Eduardo de Freitas Bernardes, pela paciência, companheirismo, demonstrações de amor, sugestões e auxílio durante a caminhada...por acreditar em meu potencial.

Ao meu irmão Enéas, pelas palavras sábias, conversas e sugestões pertinentes.

Ao meu irmão Rogério, por me mostrar sem rodeios: *"yes, you are going to do it!"*

Aos meus sobrinhos, Gustavo e Gabriela, por existirem...

À Favi Ribeiro Faleiros, pelo auxílio nos “truques” para a montagem e apresentação dos *slides*.

À Sueli de Fátima Santana, por me manter nutrida...pelas comidas gostosas...

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter me concedido a bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a compra de equipamentos necessários para a realização deste estudo.

Aos ratos, que possibilitaram a execução deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização do meu Doutorado.

“Os rins gostam muito de água
e de suco de uva...às vezes...”

Gustavo Ribeiro Faleiros, cinco anos de idade

RESUMO

FALEIROS, C. M. **Efeito do treinamento físico prévio nas alterações de função e estrutura renais provocadas pela administração de adriamicina em ratos.** 2017. 115f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A nefropatia induzida por adriamicina (ADR) em ratos é um dos modelos experimentais mais utilizados para o estudo desenvolvimento da doença renal progressiva. Uma dose única deste quimioterápico induz a proteinúria progressiva e irreversível que progride para glomeruloesclerose segmental e focal, com fusão dos processos podais e lesões tubulointersticiais. A lesão das células endoteliais glomerulares precede as alterações dos podócitos na nefropatia induzida pela ADR. A atividade física regular melhora as funções cardíacas e renais em pacientes e animais com doença renal progressiva e pode reduzir ou retardar a progressão da lesão renal. Este estudo avaliou o efeito do treinamento físico prévio na evolução da lesão renal induzida por ADR e a sua relação com o processo inflamatório, a função endotelial e angiogênese. Ratos Wistar submetidos ou não ao treinamento físico receberam ADR (2,5 mg/kg, e.v) ou solução salina fisiológica (SAL). Amostras de sangue e urina foram coletadas 60 dias após as injeções para avaliação da função renal e os rins removidos para estudos histológicos, imuno-histoquímicos, *Western blot* e de ELISA. Amostras de urina de 24 h, obtidas 7, 30 e 60 dias após a administração de ADR ou SAL, foram utilizadas para avaliação da albuminúria. Os ratos tratados com ADR apresentaram albuminúria progressiva, elevação dos níveis plasmáticos de creatinina e queda da taxa de filtração glomerular (TFG), lesão de podócitos, expansão da área mesangial, alargamento da área intersticial relativa no córtex renal, infiltração de macrófagos, aumento dos níveis de interleucina (IL)-1 β , elevação dos níveis urinários do fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e dos níveis urinários de proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), diminuição de marcação de aminopeptidase P (marcador de células endoteliais) nos glomérulos e perda de capilares peritubulares corticais, que estavam associados com reduções das expressões do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no córtex renal desses animais. Estas alterações foram menos intensas nos ratos que realizaram treinamento físico prévio ao tratamento com ADR. Em conclusão, o pré-condicionamento físico reduziu as lesões renais induzidas pela ADR. Este efeito esteve associado com as reduções do processo inflamatório, das lesões endoteliais e das alterações de fatores relacionados com o processo de angiogênese (VEGF e eNOS) no córtex renal.

Palavras-chave: Adriamicina. Angiogênese. Doença renal progressiva. Lesão endotelial. Treinamento físico prévio.

ABSTRACT

Effects of previous physical training on structural and functional renal disturbances induced by adriamycin in rats. 2017. 115f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Adriamycin (ADR)-induced nephropathy is one of the most experimental models of progressive kidney disease in rats. A single dose of this drug induces progressive and irreversible proteinuria that progresses to focal segmental glomerulosclerosis and tubulointerstitial lesions. The lesion of glomerular endothelial cells precedes the podocyte damage in nephropathy induced by ADR. Regular physical activity improves cardiac and renal functions in patients and animals with progressive renal disease and may reduce or delay the progress of impaired renal function. This study evaluated the effect of previous physical training in renal damage induced by ADR and the role of inflammation, endothelial lesions and angiogenesis in this process. Male Wistar rats submitted or not to previous physical training received ADR (2.5 mg/kg, i.v.) or physiological saline (SAL). Urine and plasma samples were collected 60 days after the injection in order to evaluate the renal function. The kidneys were removed for histological, immunohistochemical, Western blot and ELISA analysis. Twenty-four-hour urine samples were collected to dose albuminuria 7, 30 and 60 days after ADR or SAL injection. ADR-treated rats presented progressive albuminuria, increases in plasma creatinine levels, decreasing glomerular filtration rate (GFR), podocyte damage, mesangial expansion, enlargement of the tubular interstitial relative area of renal cortex, macrophage infiltration, higher interleukin (IL)-1 β levels in renal tissue, urinary transforming growth factor β (TGF- β) and urinary monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, reduction of aminopeptidase P (endothelial cell marker) in the glomeruli and cortical peritubular capillary number. Those were associated with reduction in vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expressions in renal cortex. Those alterations were less intense in the animals undergone previous exercise training. In conclusion, physical training prior to ADR injection reduced the renal damage induced by this drug. This effect was related with the reduction of the inflammatory process, endothelial lesions and with the decrease in alterations of factors related to the process of angiogenesis (VEGF and eNOS) in renal cortex.

Keywords: Adriamycin. Angiogenesis. Endothelial lesion. Previous physical training, Renal disease progression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esteira rolante adaptada para ratos, modelo EPR.....	p. 36
Figura 2 –	Representação esquemática do protocolo experimental	p. 40
Figura 3 –	Peso corporal dos grupos Sedentário e Treinado durante o período de treinamento físico prévio	p. 52
Figura 4 –	Velocidade máxima (Vmax) dos animais do grupo Treinado antes do treinamento físico e quatro semanas após a corrida em esteira rolante	p. 53
Figura 5 –	Distância percorrida pelos animais do grupo Treinado durante dois períodos: primeiro e segundo testes progressivos para estimativa da Vmax e da Performance aeróbia	p. 54
Figura 6 –	Desempenho aeróbio dos animais do grupo Treinado antes do treinamento físico e quatro semanas após a corrida em esteira rolante	p. 54
Figura 7 –	Excreção urinária de albumina nos grupos controles e experimentais, sete, 30 e 60 dias após administração de SAL ou ADR	p.56
Figura 8 –	Excreção urinária de MCP-1 (<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>) e TGF- β (<i>Transforming Growth Factor β</i>).....	p. 57
Figura 9 –	Secções histológicas coradas com Tricrômio de Masson, escore para lesão glomerular e área intersticial relativa cortical.....	p. 59
Figura 10 –	Imunorreação e escore para desmina nos glomérulos	p. 61
Figura 11 –	Imunolocalização e quantificação de células ED1-positivas (macrófagos) nos glomérulos e na área tubulointersticial do córtex renal	p. 62
Figura 12 –	Imunolocalização e escore para fibronectina nos glomérulos e no compartimento tubulointersticial cortical	p. 63
Figura 13 –	Imunorreação e escore para α -SMA (<i>α-Smooth-Muscle-Actin</i>) no córtex renal	p. 64
Figura 14 –	Imunolocalização e escore para VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) nos glomérulos e na área tubulointersticial do córtex renal	p. 65

Figura 15 –	Imunolocalização e porcentagem da área glomerular e do compartimento tubulointersticial cortical ocupados por marcação positiva para eNOS (<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>).....	p. 66
Figura 16 –	Imunorreação, escore para JG12 nos glomérulos e número de capilares peritubulares corticais	p. 67
Figura 17 –	Expressão de podocina no tecido renal, avaliada por <i>Western blot</i>	p. 68
Figura 18 –	Expressão de VEGF no tecido renal, avaliada por <i>Western blot</i>	p. 69
Figura 19 –	Expressão de eNOS no tecido renal, avaliada por <i>Western blot</i>	p. 70
Figura 20 –	Quantificação dos níveis de IL-1 β no tecido renal por ELISA	p. 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	L-arginina dimetil assimétrica (<i>Asymmetric Dimethyl-L-Arginine</i>)
ADNT	Grupo Adriamicina não Treinado
ADR	Adriamicina
ADT	Grupo Adriamicina Treinado
BH ₄	Tetra-hidrobiopterina
CNT	Grupo Controle não Treinado
creat	Creatinina
CT	Grupo Controle Treinado
DAB	3,3 diaminobenzidina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
END 1	<i>Endurance 1</i>
END 2	<i>Endurance 2</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial (<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
EPM -	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina 1
EUA	Estados Unidos da América
e.v.	Endovenoso
FAD	Flavina adenina dinucleotídio (<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>)
FE	Fração de excreção
FMN	Flavina mononucleotídio (<i>Flavin Mononucleotide</i>)
HDL	Lipoproteínas de alta intensidade
HO-1	Heme oxigenasse 1

IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina-1 β
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida (<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1 (<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>)
MFEL	Máxima fase estável de lactato
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídio (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal (<i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>)
NOS	Óxido nítrico sintase (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
P	Concentração plasmática
PBS	Solução de NaCl 0,15 M e tampão PO ₄ 0,01 M, pH 7,4
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIGF	<i>Placental Growth Fator</i>
PIP3	Fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato
Pr	Performance
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i>
SAL	Salina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TPBSt:	Solução de trizma base (0,05 M), NaCl (0,15M), tween 20 (pH 7,6)
TEI	Tempo do Estágio Incompleto
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa (<i>Tumor Necrosis Fator-α</i>)

TGF- β	Fator de crescimento transformador beta (<i>transforming growth factor β</i>)
TFG	Taxa de filtração glomerular
TTE	Tempo Total do Estágio
U	Concentração urinária
Ualb	Excreção urinária de albumina
V	Fluxo urinário
VEC	Velocidade do Estágio Completo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
Vmax	Velocidade máxima de corrida
VPF	<i>Vascular Permeability Factor</i>
α -SMA	Alfa-actina de músculo liso (<i>Alpha-Smooth-Muscle-Actin</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

dL	Decilitro
g	Gramas
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
K ⁺	Íon potássio
Kg	Kilograma
Km	Kilômetro
L	Litro
M	Molar
m	Metro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ²	Milímetro quadrado
mOsm	Miliosmol
n	Número
Na ⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Nefropatia induzida pela Adriamicina	20
1.2 Participação do endotélio na doença renal progressiva	22
1.3 Efeito do exercício físico na em doenças renais progressivas e na função endotelial	26
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 HIPÓTESE	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Animais.....	35
4.2 Delineamento experimental.....	35
4.2.1 Seleção dos ratos corredores e adaptação à esteira rolante	35
4.2.2 Teste progressivo para estimativa da velocidade máxima de corrida (Vmax) e da performance realizada (Pr).....	36
4.2.3 Determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL)	38
4.2.4 Programa de treinamento físico	38
4.2.5 Administração de solução salina fisiológica (SAL) ou adriamicina (ADR)	39
4.3 Padronização da dose de administração de adriamicina e do treinamento físico prévio	41
4.4 Peso corporal	41
4.5 Quantificação da albumina nas amostras de urina.....	41
4.6 Avaliação da função renal	42
4.6.1 Determinação do volume urinário, osmolalidade e das concentrações de Na ⁺ e K ⁺	44
4.7 Excreção urinária de MCP-1 e TGF-β	44
4.8 Análise histológica e morfométrica	44
4.9 Análise imuno-histoquímica.....	45
4.10 Análises por <i>Western blot</i>	47
4.11 Quantificação da concentração de interleucina (IL)-1β em tecido renal.....	48
4.12 Análise estatística	49

5 RESULTADOS	50
5.1 Peso corporal	51
5.2 Velocidade da MFEL e avaliação da capacidade aeróbia	53
5.3 Função renal	55
5.4 Albuminúria	56
5.5 Excreção urinária de MCP-1 e TGF- β	57
5.6 Avaliação histológica	58
5.7 Análise imuno-histoquímica	60
5.8 Análises por <i>Western blot</i>	68
5.9 Quantificação de IL-1 β no tecido renal	71
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE	104
APÊNDICE A – Artigo publicado na revista Life Sciences	105
ANEXO	114
ANEXO A – Protocolo de ética experimental	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nefropatia induzida pela Adriamicina

Um dos modelos experimentais estudados para avaliação dos mecanismos envolvidos na doença renal progressiva é o da nefropatia por adriamicina (ADR). A ADR é uma antraciclina utilizada na prática clínica para o tratamento de leucemias agudas, linfomas e alguns tumores sólidos e apresenta nefrotoxicidade renal em roedores. Em ratos, esta droga exerce toxicidade direta no tecido renal, induzindo alterações de estrutura e função renais (BARONI et al., 2000; BERTANI et al., 1982; BERTANI et al., 1986a). Yesair et al. (1972) observaram que logo após a administração endovenosa em ratos e camundongos, este quimioterápico é rapidamente depositado nos tecidos, principalmente nos rins, sendo encontrado também no intestino delgado, coração e fígado, o que pode contribuir para a nefrotoxicidade.

Vários estudos têm mostrado que a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a peroxidação lipídica possuem uma contribuição importante na nefrotoxicidade desencadeada pela ADR (MIMNAUGH, 1986; RASHID et al., 2013; YANG; SHIRONG; EPSTEIN, 2009). A ADR gera radicais semiquinonas, que por sua vez, podem reagir com moléculas de oxigênio formando superóxido e regenerando a ADR intacta ou reagir com peróxido de hidrogênio originando radicais hidroxila. As EROS reagem com componentes celulares, como lipídios e ácidos nucleicos, danificando as células (KALYANARAMAN; SEALY; SINHA; 1984; YANG; SHIRONG; EPSTEIN, 2009). Em estudo realizado com cultura de células epiteliais glomerulares expostas à ADR, foi observada lesão podocitária decorrente do estresse oxidativo (GAO et al., 2014). Zhu et al. (2014) constataram lesão mitocondrial nos podócitos produzida por superóxidos formados 24 horas após administração de ADR.

Logo após os primeiros dias da administração de ADR observa-se perda parcial da estrutura podocitária, e após um mês, fusão de processos podais (BERTANI et al., 1982). As lesões iniciais evoluem para perda completa dos processos podais e no último estágio, glomeruloesclerose segmentar e focal (LEE; HARRIS, 2011; OKUDA et al., 1986). Várias evidências experimentais sugerem que o desnudamento da membrana basal glomerular observada na esclerose glomerular segmentar e focal, devido à lesão com perda de processos podais, pode provocar a

adesão da membrana basal glomerular às células do epitélio parietal da cápsula de Bowman. Em consequência, o filtrado que deveria ser liberado para cápsula de Bowman, vai para o compartimento intersticial, desencadeando proliferação das células periglomerulares, com formação de crescentes. Além disso, a expansão do espaço intersticial provoca o desligamento da membrana basal tubular do seu epitélio e degeneração dos túbulos renais, com o aparecimento de glomérulos sem túbulos (KRIZ, 2003; KRIZ et al., 2001).

Uma manifestação marcante do modelo da lesão renal induzida pela ADR é a proteinúria, que aparece na primeira semana após a injeção de uma dose única de ADR, ocorrendo posteriormente, um aumento progressivo na sua intensidade (BARONI et al., 1999; BARONI et al., 2000; SHU et al., 2002; WU et al., 2005). A proteinúria foi associada com a redução dos componentes aniônicos da parede dos capilares glomerulares que ocorria logo nas fases iniciais da lesão (BERTANI et al., 1982). Estudo posterior demonstrou que o surgimento de albumina na urina estava relacionado com alterações da barreira de filtração, com perda tanto da sua seletividade para carga elétrica como para o peso molecular das proteínas, em decorrência da redução da espessura da camada do glicocálice do endotélio glomerular (JEANSSON et al., 2009).

Várias evidências clínicas e experimentais têm mostrado a participação da proteinúria na lesão túbulointersticial observada nas glomerulopatias (BARONI et al., 1999; BARONI et al., 2000; EARDLEY et al., 2006; EDDY, 2004; ZOJA; ABBATE; REMUZZI, 2015). As proteínas que atravessam a barreira de filtração glomerular, em condições em que ocorrem alterações da mesma, são amplamente reabsorvidas principalmente pelos túbulos proximais, sendo acumuladas no citoplasma destas células, desencadeando ruptura da membrana basolateral e um processo inflamatório intersticial (BERTANI et al., 1986b; ZOJA; BENIGNI; REMUZZI, 2004). Um estudo realizado em nosso laboratório evidenciou a relação temporal entre a albuminúria, captação de albumina pelas células tubulares renais e a lesão túbulointersticial induzida pela administração de ADR (GALLI et al., 2001). As células tubulares adquirem um fenótipo pró-inflamatório após a captação de proteínas, passando a produzir e liberar citocinas e outras substâncias inflamatórias, mediadores vasoativos e pró-fibróticos para o compartimento intersticial, desencadeando a fibrose com perda progressiva da função renal (TANG et al., 2002; WOHLFARTH et al., 2003; ZOJA; BENIGNI; REMUZZI, 2004).

Em estudos “*in vitro*” com células tubulares proximais polarizadas expostas às altas concentrações de proteínas foi observado estímulo da produção por essas células de RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1* = fator quimiotático para monócito/macrófago) e ET-1 (endotelina 1), um mediador que estimula a infiltração de macrófagos e a produção de matriz extracelular; sendo todos liberados para o interstício via membrana basolateral (WANG et al., 1997; ZOJA et al., 1995; ZOJA et al., 1998). Além disso, estudos realizados com modelos experimentais de nefropatia crônica e com células tubulares proximais humanas expostas à transferrina (proteína plasmática) evidenciaram uma associação entre a expressão elevada de quimiocinas nas células tubulares e acúmulo de células inflamatórias no interstício renal com a proteinúria (LUI et al., 2009; SHIMIZU et al., 2003; TANG et al., 2002). Em consequência, ocorre o recrutamento de monócitos/macrófagos no interstício, formação de matriz extracelular e liberação de citocinas por essas células, como o fator de crescimento transformador beta (*transforming growth factor β* - TGF- β), ET-1 e fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor* - PDGF) (ABBATE; ZOJA; REMUZZI, 2006; LUI et al., 2009; SHIMIZU et al., 2003; TANG et al., 2002).

As células tubulares também são capazes de liberar colágeno tipo I, colágeno tipo V e TGF- β diretamente para o interstício, contribuindo para a fibrogênese, agravando o processo de fibrose renal (ABBATE; ZOJA; REMUZZI, 2006; NICULESCU-DUVAZ et al., 2007). No modelo de nefropatia induzida por adriamicina, as lesões iniciais evoluem, portanto, para o intenso comprometimento do compartimento tubulointersticial, marcado por infiltrado inflamatório intersticial, dilatação da luz tubular, atrofia das células tubulares, formação de cilindros intraluminais, expansão do volume intersticial e fibrose intersticial (ANAN et al., 2016; BARONI et al., 2000; SHU et al., 2002; WANG et al., 2000).

1.2 Participação do endotélio na doença renal progressiva

O endotélio é formado por uma camada de células especializadas que se localiza na face luminal dos vasos sanguíneos e dos capilares. Devido a sua

localização e à sua especificidade, as células endoteliais são capazes de receber e transmitir informações neuro-hormonais e físicas de forma bidirecional, através da permeabilidade seletiva ou pela ativação de mediadores responsáveis pelo transporte de solutos, que atravessam os capilares, alcançando os tecidos. Estas funções são realizadas através de receptores de membrana para diversas moléculas, incluindo proteínas, partículas transportadoras de lipídios, hormônios, metabólitos e por meio de proteínas juncionais, que por sua vez, regulam a interação entre células e entre células e matriz extracelular (BOULANGER, 2016; CINES et al., 1998). Desta forma, o endotélio possibilita a integração de sinais químicos e físicos advindos do sangue e dos tecidos circundantes gerando respostas como a regulação do fluxo de nutrientes, tráfego de hormônios, tônus vascular, recrutamento de neutrófilos e outras células inflamatórias, adesão e proliferação celular, angiogênese e manutenção da homeostase (BOULANGER, 2016; CINES et al., 1998; RAJENDRAN et al., 2013). Nos rins, além dessas funções, o endotélio participa da barreira de filtração glomerular, em associação com a membrana basal glomerular e podócitos, contribuindo para filtração seletiva de componentes sanguíneos e formação do ultrafiltrado (SCOTT; QUAGGIN, 2015).

A disfunção endotelial constitui-se uma importante característica da doença renal progressiva (GOLIGORSKY, 2015; RADENKOVIC; STOJANOVIC; PROSTRAN, 2016). A lesão endotelial provoca o aumento da expressão de moléculas de adesão, ligação de leucócitos ao endotélio, com congestão vascular e infiltração dessas células no compartimento intersticial (KANG et al., 2002; MOLITORIS; SUTTON, 2004). As lesões endoteliais resultam em alterações da microvasculatura renal, observadas em diferentes doenças renais clínicas e experimentais. Ao analisar biópsias de pacientes com nefropatia por imunoglobulina A (IgA) com lesões glomerulares agudas e crônicas, Kusano et al. (2016) detectaram redução do número de capilares glomerulares. Nas lesões glomerulares agudas, a diminuição de capilares foi observada em associação com a infiltração de células inflamatórias, exsudação de fibrina, formação de crescentes e ruptura da membrana basal glomerular. Nas lesões glomerulares crônicas, a redução dos capilares glomerulares foi seguida de glomeruloesclerose segmentar e focal. No modelo de nefropatia induzida por ADR, Sun et al. (2013) demonstraram que a lesão das células endoteliais dos capilares glomerulares precede as alterações dos processos podais das células epiteliais. Bohle, Mackensen-Haen e Wehrmann (1996)

estudando biópsias de pacientes com diferentes nefropatias crônicas, observaram correlação negativa entre o número de capilares peritubulares e creatinina sérica, evidenciando uma relação entre rarefação capilar peritubular e redução da função renal.

O desenvolvimento da disfunção endotelial na doença renal progressiva é multifatorial. Estudos clínicos e experimentais indicam que as lesões endoteliais estão associadas com a redução da síntese e biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (KANG et al., 2002; LEE et al., 2016; SCHMIDT et al., 1999). O NO é um radical livre, lipossolúvel, produzido a partir da conversão do substrato L-arginina em citrulina e NO, pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS): a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Todas as isoformas de NOS utilizam fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídio (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), tetrahidrobiopterina (BH4) e heme como cofatores, porém a eNOS e a nNOS são enzimas dependentes de cálcio (Ca^{2+}) (DUDZINSKI et al., 2006; FARRELL; BLAKE, 1996). A eNOS é a principal isoforma associada à regulação da função vascular, e sua ação é desencadeada ou intensificada por diversos estímulos como o estresse de cisalhamento produzido pela força do sangue ao passar pelo endotélio; pela interação entre agonistas endógenos e receptores de membrana nas células endoteliais, como exemplo, histamina e a bradicinina; por hormônios sexuais, como o estrógeno; e por fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BOO et al., 2002; BOULOUMIÉ; SCHINKERTH; BUSSE, 1999; LEE et al., 2016; VANHOUTTE, 2003; VANHOUTTE et al., 2009; WEINER et al., 1994). Contudo, fatores como estresse oxidativo, elevação de L-arginina dimetil assimétrica (ADMA), aumento do nível de proteína reativa C, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e hipóxia tecidual reduzem a expressão de eNOS (HEIN et al., 2009; KAGIMOTO et al., 2012; LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2013; McQUILLAN et al., 1994, YAN et al., 2008).

Nos rins, a expressão da eNOS foi observada nas artérias e arteríolas, capilares glomerulares, na porção descendente medular dos vasos retos e nos túbulos renais. Entretanto, sua expressão não foi detectada nos capilares corticais e endotélio venoso cortical. (BACHMANN; BOSSE; MUNDEL, 1995; MOUNT; POWER, 2006). Estudos experimentais têm demonstrado que a deficiência de eNOS acelera a lesão renal em vários modelos de desenvolvimento de patologias

renais, como nefropatia diabética, nefropatia induzida por adriamicina e por nefrectomia sub-total, além de glomerulonefrite anti-membrana basal glomerular (HEERINGA et al., 2000; NAKAYAMA et al., 2007; NAKAYAMA et al., 2009; SUN et al., 2013). Nakayama et al. (2009) utilizando camundongos *knockout* para eNOS em modelo de nefrectomia 5/6, demonstraram que a ausência de eNOS agravou as alterações da função renal e a albuminúria, intensificou a infiltração de macrófagos, as alterações histológicas glomerulares e tubulointersticiais e fibrose, além de provocar perda de células endoteliais. Sun et al. (2013) observaram que a deficiência de eNOS em camundongos C57BL6/J (cepa conhecida por ser resistente à ADR) resultou em aumento da quantidade de proteínas na urina, glomeruloesclerose, fibrose tubulointersticial e redução do número de células endoteliais glomerulares após a administração de ADR. Essas observações mostram que a eNOS pode exercer um efeito protetor em doenças renais, além de manter a integridade das células endoteliais.

A manutenção da microvasculatura renal é essencial para a prevenção de doenças renais. A integridade dos capilares glomerulares contribui para manutenção da taxa de filtração glomerular, enquanto que a integridade dos capilares peritubulares possibilita o fornecimento de oxigênio e nutrientes para as células tubulares renais e para o interstício peritubular. Um dos mecanismos que também pode estar relacionado com a disfunção endotelial é a alteração do balanço local entre fatores angiogênicos responsáveis pela sobrevivência das células endoteliais (KANG et al., 2002). O VEGF é considerado como um importante fator de crescimento para as células endoteliais (FERRARA; DAVIS-SMITH, 1997; FERRARA; HENZEL, 1989). O VEGF pertence a uma família de proteínas que inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e *placental growth factor* (PIGF), sendo o VEGF-A, também denominado apenas como VEGF (FERRARA, 1999). Esta proteína teve sua primeira descrição em 1983, com denominação inicial de *vascular permeability factor* (VPF) e foi considerada como um mediador específico da alta permeabilidade de vasos sanguíneos observada em tumores malignos (SENGER et al., 1983). Posteriormente, Ferrara e Henzel (1989) realizaram a purificação e a caracterização deste fator de crescimento endotelial e observaram que este possuía uma forte atividade mitogênica para células endoteliais vasculares, denominando-o como VEGF. Além das ações relacionadas à elevação da permeabilidade vascular e à proliferação endotelial, o VEGF também promove a

migração, diferenciação e sobrevivência das células endoteliais e medeia a vasodilatação derivada do endotélio (FERRARA, 1999; GERBER; DIXIT; FERRARA, 1998; GERBER et al., 1998).

Nos rins, o VEGF é expresso nas células epiteliais glomerulares e nos túbulos renais e se liga aos seus receptores no endotélio glomerular e nas células endoteliais peritubulares, respectivamente (EREMINA et al., 2003; KANELIS et al., 2000; NAKAYAMA et al., 2013; TUFRO et al., 1999) e está relacionado com a manutenção dos capilares glomerulares e peritubulares (DIMKE et al., 2015; EREMINA et al., 2008; KITAMOTO et al., 2001). Em condições patológicas, como na nefropatia diabética, estudos indicam que ocorre elevação da expressão de VEGF (CHEN et al., 2015; KANESAKI et al., 2005; KIM et al., 2000), sendo a hiperglicemia um fator central na estimulação desta proteína (KIM et al., 2000; NAKAYAMA et al., 2007; ONOZAKI et al., 2004). Níveis elevados de VEGF podem exercer efeitos deletérios nos rins, como exemplo, expansão mesangial, hipertrofia glomerular e angiogênese anormal, resultando em formação de vasos supérfluos nos glomérulos, que podem alterar a hemodinâmica renal, agravando a nefropatia diabética (KANESAKI et al., 2005; ONOZAKI et al., 2004; VRIESE, et al., 2001). Contudo, em modelos de doenças renais progressivas não diabéticas, como na nefrotoxicidade por ciclosporina A, na nefropatia induzida por ablação renal e por adriamicina, foi observada redução dos níveis de VEGF associada à diminuição do número de células endoteliais, rarefação capilar e injúria renal (KAIRAITIS et al., 2005; KANG et al., 2001a; KANG et al., 2001b). Nos dois primeiros modelos citados acima, a administração de VEGF foi capaz de reduzir as lesões renais (KANG et al., 2001b; KANG et al., 2001c). Essas observações mostram que alterações na expressão de VEGF estão relacionadas com disfunções endoteliais em doenças renais.

1.3 Efeito do exercício físico em doenças renais progressivas e na função endotelial

Diversos estudos clínicos e experimentais têm mostrado que a prática de atividade física regular pode contribuir para a prevenção de diversas doenças crônicas como alguns tipos de câncer, hipertensão, doenças cardiovasculares,

diabetes, obesidade, depressão, isquemia cerebral, demência e osteoporose (BORER, 2005; CHENG, 2016; DIAZ; SHIMBO, 2013; ENDRES et al., 2003; FARREL et al., 2007; FORD, 2002; GALLANAGH et al., 2011; KNOWLER et al., 2002; LAKKA; LAAKSONEN, 2007; POIRIER; DESPRÉS, 2001; THOMPSON et al., 2003; WING; HILL, 2001; XU, Ying et al., 2016). Em um estudo de coorte prospectivo observacional, foi observado que a prática de atividade física regular durante a “meia idade” estava associada à redução do risco de desenvolvimento de doenças renais crônicas em idade mais avançada, como no caso de indivíduos com diabetes mellitus, doença esta considerada uma das principais causas de doença renal progressiva (DEFINA et al., 2016).

A realização do treinamento físico está associada com melhora das funções cognitivas, como o aprendizado e a memória; regulação da composição corporal ao proporcionar o controle de massa corporal, regulação do perfil lipoproteico, reduzindo os níveis circulantes de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de triglicerídeos e elevando os níveis de lipoproteínas de alta intensidade (HDL), redução da inflamação sistêmica e da resistência à insulina. Além disso, exercícios físicos contribuem para redução da pressão arterial em pacientes hipertensos, melhoram o fluxo coronário e a função cardíaca e endotelial (BERCHTOLD; CASTELLO; COTMAN, 2010; DI FRANCESCO MARINO et al., 2009; DIMEO et al., 2012; FORD, 2002; GALLANAGH et al., 2011; JENNINGS et al., 1986; KELLEY, G. A.; KELLEY, K. S., 2006; MOYNA; THOMPSON, 2004; STEFANICK et al., 1998; WHELTON et al., 2002)

Estudos clínicos evidenciaram que o treinamento físico é capaz de melhorar a função endotelial em pacientes com doença cardiovascular e com síndrome metabólica (HAMBRECHT et al., 2003; LINKE; ERBS; HAMBRECH, 2008; TJONNA et al., 2011). Wang, Wolin e Hintze (1993) mostraram que o treinamento físico aumenta a vasodilatação dependente de endotélio em artérias epicardiais de cães. A atividade física pode melhorar a função endotelial por mecanismos que envolvem a elevação da produção de NO e angiogênese. Tinken et al. (2010) constataram que o aumento do estresse de cisalhamento provocado por consecutivas séries de exercício físico medeia a adaptação endotelial e remodelação vascular em humanos saudáveis. O fluxo sanguíneo gera forças que variam em relação à direção e magnitude e age no endotélio por meio da força friccional em sua parede, gerando o estresse de cisalhamento, que por sua vez está envolvido na estimulação da

produção de NO e na formação de novos vasos (DAVIES, 1995; HARAM; KEMI; WISLOFF, 2008; RESNICK et al., 2003). A eNOS é principal enzima responsável pela produção de NO derivada do endotélio e sua expressão é aumentada pelo estresse de cisalhamento e treinamento físico (ENDRES et al., 2003; FÖRSTERMANN et al., 1994; HAMBRECHT et al., 2003; HARAM; KEMI; WISLOFF, 2008). Gertz et al. (2006) utilizando modelo de camundongos submetidos à atividade física prévia à isquemia cerebral, mostraram que a elevação da expressão de eNOS pode mediar os efeitos protetivos do treinamento físico e que nos camundongos tratados com inibidores de NOS ou deficientes de eNOS, este efeito protetor da atividade física era completamente abolido.

O VEGF, um importante fator mitogênico, pode estar associado com os benefícios do exercício físico. Gustafsson et al. (2001) mostraram que após oito semanas de treinamento físico em indivíduos com falência cardíaca crônica, houve elevação dos níveis de VEGF em biópsias de músculo esquelético, sugerindo que este fator possa estar envolvido na angiogênese induzida pelo exercício em pacientes com infarto do miocárdio. Além disso, Williams et al. (2006) observaram que neutralização do VEGF em camundongos reduzia a resposta angiogênica durante o estresse de cisalhamento em músculo esquelético.

Existem também várias evidências que a prática de atividade física apresenta benefícios mesmo após o desenvolvimento de doenças que acometem os rins. O treinamento físico reduz o risco de mortalidade e melhora a qualidade de vida de pacientes em hemodiálise, além de aumentar a densidade capilar muscular nestes indivíduos (LEWIS et al., 2015; TENTORI et al., 2010). Em um estudo clínico realizado com pacientes diabéticos que apresentavam alterações da função renal foi observada melhora na taxa de filtração glomerular após 12 semanas de treinamento físico (NYLEN et al., 2015). Utilizando modelo experimental de indução de diabetes em ratos, Ito et al. (2015) demonstraram que a corrida em esteira rolante durante oito semanas foi capaz de reduzir a proteinúria e a intensidade das lesões renais nesses animais, sendo estes efeitos associados à elevação da expressão de eNOS e nNOS nos rins dos animais treinados. Além disso, foi também verificado que o exercício físico regular melhora as funções cardíacas e renais em pacientes e animais com doença renal crônica e pode reduzir ou retardar a progressão da lesão renal (HOWDEN et al., 2013; LUIZ et al., 2013; PECHTER; RAAG; ROSENBERG, 2014). Contudo, poucos estudos mostram o efeito do condicionamento físico prévio

na evolução de doenças renais progressivas. Amaral et al. (2016) demonstraram que o pré-condicionamento físico durante quatro semanas em esteira rolante atenuava a perda de peso, glicemia e as alterações da função renal em ratas com diabetes induzida pela administração de estreptozotocina. Utilizando o mesmo modelo de indução de diabetes em ratos, Silva et al. (2012) também observaram que o condicionamento físico prévio, além de apresentar benefícios em relação à função renal, foi capaz de melhorar a função cardíaca destes animais. No entanto, estes estudos não avaliaram a influência da atividade física prévia no endotélio renal.

Considerando esses fatos, o presente estudo visou avaliar os possíveis efeitos do treinamento físico prévio à administração de adriamicina em ratos, nas alterações da estrutura e função renais induzidas por essa droga e suas relações com as lesões endoteliais e a angiogênese observada no córtex renal de ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos do treinamento físico prévio na evolução da lesão renal induzida por adriamicina e a sua relação com a função endotelial e com a angiogênese.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações de função e estrutura renais em ratos tratados com adriamicina submetidos ou não ao treinamento físico prévio.
- Analisar influência do condicionamento físico prévio na função das células endoteliais renais e na angiogênese em ratos tratados com adriamicina.
- Analisar os efeitos do treinamento físico prévio no processo inflamatório renal desencadeado pela administração de adriamicina.

3 HIPÓTESE

O treinamento físico prévio pode ter um efeito renoprotetor na lesão renal induzida pela adriamicina, atenuando as alterações de estrutura e função renais provocadas por esse quimioterápico. Esse efeito pode estar relacionado com a influência do pré-treinamento na função das células endoteliais, na angiogênese e no processo inflamatório renal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratos Wistar machos de 70-80 g (n=35), provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina, em ambiente com temperatura e ciclo de luz controlados (22°C; 12 h claro/12 h escuro) e receberam água e ração *ad libitum*, sendo mantidos quatro animais por caixa. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O projeto (protocolo nº 001/2013) foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Seleção dos ratos corredores e adaptação à esteira rolante

Os animais foram inicialmente selecionados/adaptados de acordo com sua capacidade de realizar corrida em um modelo de esteira rolante EPR (Gesan, São Paulo, Brasil) (0% de inclinação) (**Figura 1**). A seleção/adaptação ocorreu em um período de cinco dias, com sessões diárias, duração (5 até 20 mim) e velocidade progressivas (5 até 20 m/mim) (**Quadro 1**), nas quais foram selecionados os ratos que apresentaram resposta positiva ao estímulo de corrida pelo menos três vezes. O objetivo da adaptação também foi a redução dos níveis de estresse apresentados pelo animal frente a uma tarefa desconhecida. O delineamento experimental está representado na **Figura 2**.

Duração (min)	Velocidade (m/min)	Dia
5	5	1º
10	10	2º
15	15	3º
15	15	4º
20	20	5º

Quadro 1 – Duração e velocidade do processo de seleção/adaptação dos animais durante cinco dias.

Figura 1 – Esteira rolante adaptada para ratos, modelo EPR (Gesan, São Paulo, Brasil).

4.2.2 Teste progressivo para estimativa da velocidade máxima de corrida (V_{max}) e da performance realizada (Pr)

No sexto dia, após a pesagem dos animais, foi realizado o teste progressivo para estimativa da V_{max} , que foi iniciado com velocidade de 6 m/min, 0% de inclinação da esteira rolante e incrementos de 3 m/min a cada 3 min até a exaustão voluntária dos ratos, que foi assumida como a incapacidade dos mesmos em manterem o padrão de corrida durante a velocidade pré-determinada (FELIX; MICHELINI, 2007; FERREIRA et al., 2007). Para os animais que entraram em exaustão sem completar os estágios, a V_{max} foi ajustada por meio da utilização da

equação adaptada para o modelo animal, que foi proposta inicialmente para o ciclismo em seres humanos (KUIPERS et al., 1985).

$$V_{\max} = VEC + (TEI/TTE) \times I \text{ onde:}$$

VEC: Velocidade do Estágio Completo;

TEI: Tempo do Estágio Incompleto;

TTE: Tempo Total do Estágio;

I: Incremento de Intensidade.

Para estimativa do desempenho aeróbio realizado durante o teste progressivo para estimativa da $V_{\max}$, foi utilizado o modelo dependente de massa, adaptado de Ferraresco et al. (2012), o qual permite a quantificação da performance de cada rato a partir do trabalho mecânico realizado enquanto o animal corre na esteira rolante, utilizando a fórmula:

$$Pr = \sum Pri = \sum mViTi = \sum mDi = mD, \text{ onde:}$$

Pr: Performance dos ratos;

Pri: Performance de cada rato em cada estágio de 3 min;

m: Massa corporal;

Vi: velocidade do estágio;

Ti: tempo durante o estágio;

Di: distância percorrida durante o estágio;

D: distância total percorrida

Pr foi expresso em Kg.m

Ao final da quarta semana de treinamento aeróbio, o teste progressivo para estimativa da $V_{\max}$ e da Pr foi repetido no intuito de auxiliar na avaliação da capacidade aeróbia.

4.2.3 Determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL)

A MFEL corresponde à maior intensidade de exercício mantida durante o tempo sem que ocorra acumulação contínua de lactato sanguíneo, ou seja, quando há equivalência entre a entrada e a remoção de lactato no sangue, e este teste é considerado um importante indicador para a determinação da capacidade aeróbia (BENEKE; HÜTLER; LEITHÄUSER, 2000; CUNHA et al., 2009; MANCHADO et al., 2005). Quarenta e oito horas após a realização do teste progressivo para estimativa da Vmax e da Pr foi realizado o teste da MFEL. A velocidade inicial para a determinação da MFEL foi definida a partir do cálculo de 80% da Vmax encontrada no teste anterior. Os animais executaram testes contínuos com duração de 30 min, separados por um intervalo de 48 h de descanso. Em todos os testes, a extremidade distal da cauda dos animais foi seccionada e 25 µl de sangue foram coletados utilizando tubos capilares heparinizados durante o repouso e após 10, 20 e 30 min de exercício. Imediatamente, as amostras foram diluídas em 50 µL de fluoreto de sódio (NaF) à 1% e analisadas em lactímetro eletroquímico (YSI 2300 STAT PLUS, Yellow Spring, USA), para posterior verificação dos níveis de lactato em cada intensidade. A MFEL foi assumida como a mais alta intensidade de exercício na qual o aumento de lactato no sangue não excedeu 1 mM/L ao subtrairmos os resultados obtidos dos 30 min menos 10 min de exercício (adaptado de MANCHADO et al., 2005). Este teste teve duração de seis dias, correspondendo a três sessões. Posteriormente, os ratos foram divididos em dois grupos: Treinados (n=14) e Sedentários (n=13).

4.2.4 Programa de treinamento físico

Todo o protocolo experimental foi realizado em condições ambientais idênticas às ocorridas durante o período de adaptação. A prescrição das intensidades de exercício foi baseada nos valores obtidos a partir do teste da MFEL.

O programa de treinamento físico teve duração de quatro semanas, com frequência de cinco dias/semana e foi realizado com intensidade e duração diária

variadas, de acordo com dois níveis de treinamento aeróbio/resistência: fácil = Endurance 1 (END-1), e moderado = Endurance 2 (END-2) (**Quadro 2**). O treinamento no nível END-1 compreendeu os exercícios contínuos com duração de 60 minutos, utilizando 50% da intensidade da MFEL e o treinamento no nível END-2 correspondeu à corrida contínua na esteira rolante, com duração de 30 minutos, utilizando 100% da intensidade da MFEL. Este modelo de treinamento foi adaptado de De Araujo et al. (2010, 2012).

Semanas	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
1	END-1	END-2	END-1	END-2	END-1
2	END-2	END-1	END-2	END-1	END-2
3	END-2	END-1	END-2	END-1	END-2
4	END-2	END-1	END-2	END-1	END-2

Quadro 2 - Modelo de treinamento utilizado para indução do desenvolvimento da capacidade aeróbia, utilizando os níveis de treino aeróbio/resistência END-1 e END-2, ao longo de quatro semanas. [Adaptado de Araújo et al. (2010, 2012)].

4.2.5 Administração de solução salina fisiológica (SAL) ou adriamicina (ADR)

Quarenta e oito horas após a segunda realização do teste progressivo para estimativa da Vmax e da MFEL, os ratos foram anestesiados utilizando isoflurano (BioChimico, Itatiaia, Brasil) e uma única dose de ADR (Libby, Barra Funda, Brasil) ou SAL (NaCl a 0,15 M), 2,5 mg/kg, e.v. foi administrada pela veia peniana. Os animais não foram mais submetidos ao treinamento físico.

Delineamento experimental

Figura 2 – Representação esquemática do protocolo experimental.

Desta forma, os grupos Sedentários e Treinados foram subdivididos em quatro grupos:

- A. Grupo Controle não Treinado (CNT; n=06):** receberam injeção de SAL;
- B. Grupo Adriamicina não Treinado (ADNT; n=07):** receberam uma injeção de ADR;
- C. Grupo Controle Treinado (CT; n=06):** animais submetidos ao treinamento físico prévio que receberam uma injeção de SAL;
- D. Grupo Adriamicina Treinado (ADT; n=08):** animais submetidos ao treinamento físico prévio que receberam uma injeção de ADR.

Após a administração de SAL ou ADR, os animais foram acompanhados por um período de 60 dias.

4.3 Padronização da dose de administração de adriamicina e do treinamento físico prévio

Realizamos previamente um estudo piloto, no qual a faixa de peso inicial foi de 180-220 g, o período de treinamento físico prévio foi de oito semanas e a dose administrada de ADR foi semelhante à utilizada em trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório: 3,5 mg/kg, e.v (BARONI et al., 1999; BARONI et al., 2000; FRANCESCATO et al., 2011; GALLI et al., 2001). Nestes estudos, a droga foi administrada em ratos mais jovens e com menor peso corporal, porém devido ao período prolongado do protocolo de treinamento físico em nosso estudo, os animais tornaram-se mais velhos, aumentando a nefrotoxicidade da ADR (HAHN et al., 2004). Durante os 60 dias subsequentes à injeção de ADR, a mortalidade dos animais foi de 47%. Desta forma, solicitamos animais com faixa de peso inicial de 70-80 g para que o aumento de massa corporal e idade ao final do treinamento físico fossem mais adequados ao modelo experimental e reduzimos a dose de ADR para 2,5 mg/kg, e.v. e o período de pré-condicionamento físico para quatro semanas.

4.4 Peso corporal

Durante o estudo, o acompanhamento do peso corporal foi realizado desde a primeira realização do teste progressivo para estimativa da Vmax, Pr e da MFEL até o final do experimento (60º dia após administração de ADR ou SAL).

4.5 Quantificação da albumina nas amostras de urina

Nos dias 6, 29 e 59 após injeção de ADR ou SAL, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e amostras de 24 h de urina foram coletadas para determinação da excreção urinária de albumina. As amostras foram conservadas em

azida sódica à temperatura de -20°C . O método de dosagem usado foi o eletroimunoensaio em gel de agarose desenvolvido por Laurell (1972) e adaptado por Coimbra et al. (1983). Foram utilizados neste procedimento anticorpo anti-albumina de rato, soluções padrões contendo 0,04; 0,06 e 0,1 mg/mL de albumina de rato, agarose (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) e tampão tris-acetato, pH=8,6.

4.6 Avaliação da função renal

As funções renais dos animais dos grupos controles e experimentais foram avaliadas no 60º dia após a administração de SAL ou ADR, pela quantificação da creatinina plasmática e urinária utilizando método colorimétrico e ácido pícrico como cromógeno (HAUGEN, 1953). Os animais foram anestesiados com tionembutal (40mg/Kg de peso corporal) e foi realizada a traqueostomia. Posteriormente, a aorta abdominal foi canulada para a coleta de sangue e a bexiga foi canulada para a coleta de urina. As amostras de sangue e urina foram utilizadas para as seguintes quantificações:

- Fluxo urinário (V)
- Osmolalidade urinária
- Concentrações urinárias e plasmáticas de creatinina para determinação da taxa de filtração glomerular (TFG)
- Concentração de sódio (Na^+) e potássio (K^+) no plasma e na urina.

Os dados obtidos foram usados para a avaliação dos parâmetros de função renal:

$$\text{TGF} = \text{U}_{\text{creat}} \times \text{V} / \text{P}_{\text{creat}}, \text{ onde}$$

TGF : taxa de filtração glomerular (mL/min/100 g de peso);

U_{creat} : concentração urinária de creatinina (mg/dL);

V : fluxo urinário (mL/min/100 g de peso);

P_{creat} : = concentração plasmática de creatinina (mg/dL).

$$\text{FE} = \text{U}_{\text{Na}^+} \times \text{V} / \text{TGF} \times \text{P}_{\text{Na}^+}, \text{ onde}$$

FE : fração de excreção;

U_{Na⁺} x V : carga excretada de sódio;

TGF x P_{Na⁺} : carga filtrada de sódio.

$$\text{FE} = \text{U}_{\text{K}^+} \times \text{V} / \text{TGF} \times \text{P}_{\text{K}^+}, \text{ onde}$$

U_{K⁺} x V : carga excretada de potássio;

TGF x P_{K⁺} : carga filtrada de potássio.

As amostras de urina também foram coletadas neste período para análise de TGF-β e MCP-1.

Posteriormente, os rins foram perfundidos com solução de PBS pH 7,4 (NaCl 0,15 M e tampão PO₄ 0,01 M) e, em seguida, um rim foi perfundido com solução fixadora (paraformaldeído 4%). Fragmentos desse rim foram pós-fixados por 2 horas em solução de paraformaldeído 4% e em seguida, com solução de Bouin por 4 horas. Posteriormente, esta solução foi trocada por solução de etanol 70% e foram feitas várias trocas até a retirada total do Bouin. Os fragmentos foram incluídos em parafina para a realização dos estudos de imuno-histoquímica e histologia. O outro rim perfundido apenas com PBS foi removido para preparação do lisado renal. Ao término da realização destes procedimentos, os animais foram sacrificados com excesso de anestésico.

4.6.1 Determinação do volume urinário, osmolalidade e das concentrações de Na^+ e K^+

O volume urinário dos animais foi mensurado em proveta graduada, após coleta de urina de 24 h em gaiolas metabólicas (60 dias após injeção de SAL ou ADR). A osmolalidade urinária foi determinada em osmômetro (The Advanced Osmometer Modelo 3250; Advanced Instruments, Norwood, EUA), baseando-se no método do abaixamento do ponto de congelação. As concentrações de sódio (Na^+) e potássio (K^+), urinário e plasmático, foram analisadas pela técnica de medição por eletrodos de íons seletivos (9180 Analisador de Eletrólitos, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

4.7 Excreção urinária de MCP-1 e TGF- β

As amostras de urina coletadas diretamente da bexiga foram tratadas com fluoreto de fenilmetilsulfonil (1mM) (PMSF, Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) e estocadas à -70°C . A quantificação de TGF- β e MCP-1 foi realizada por imunoenensaio enzimático (ELISA) usando kit comercial (Promega Corporation, Madison, USA e Pierce, Rockford, USA, respectivamente). Os valores de TGF- β e MCP-1 foram expressos em pg/mg de creatinina.

4.8 Análise histológica e morfométrica

Cortes (3 μm) dos rins dos animais dos grupos controles e experimentais foram corados com Tricrômio de Masson para análise do comprometimento glomerular e tubulointersticial sob microscopia de luz. As alterações glomerulares foram avaliadas por escores que refletem a extensão da lesão (**Quadro 3**), em 50 glomérulos de cada rato, sendo os valores médios calculados por animal. As lesões tubulointersticiais do córtex renal foram avaliadas por meio da determinação da área

intersticial relativa no córtex renal em vinte campos consecutivos (0,1 mm² cada) de cada rim. A área intersticial foi circundada manualmente e, em seguida, determinada por morfometria computacional (Axion versão 4.8.3, Zeiss, Alemanha) e os valores médios foram calculados por rim.

Escores	Análise histológica e imuno-histoquímica
0	0% a 5% da área acometida
1	Entre 5% e 25% da área acometida
2	Entre 25% e 50% da área acometida
3	Entre 50% e 75% da área acometida
4	De 75% a 100% da área acometida

Quadro 3 – Escore para análise de alterações histológicas e de imuno-histoquímica (KLIEM et al., 1996)

4.9 Análise imuno-histoquímica

Secções do tecido renal de 3 µm incluídos em parafina de todos os grupos de animais foram colocados em três banhos consecutivos de xilol, para a eliminação da parafina e em seguida colocados em três banhos de álcool em concentrações decrescentes para a hidratação do corte. As lâminas foram então incubadas por 10 min em solução contendo azida sódica à 10% e água oxigenada à 30%, para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Logo após, foram lavadas em PBS por 5 min e os cortes incubados com os seguintes anticorpos primários:

- Anti-desmina de rato: monoclonal (Dako, Glostrup, Dinamarca), incubação por 60 min em temperatura ambiente (1/100). Este anticorpo foi utilizado para detecção de lesões dos processos podais;
- Anti-fibronectina de rato: policlonal (Chemicon International, Temecula, EUA), incubação por 60 min em temperatura ambiente (1/500), para avaliação da acumulação de matriz extracelular nos glomérulos e na área tubulointersticial do córtex renal;

- Anti-ED1 de rato: monoclonal (Serotec, Oxford, Reino Unido), incubação por 60 min em temperatura ambiente (1/1000), para verificação de infiltração de macrófagos no córtex renal. Este anticorpo reage com o antígeno citoplasmático presente no citoplasma de macrófagos e monócitos (DIJKSTRA et al., 1985).
- Anti-alfa-actina de músculo liso (α -SMA) de rato: monoclonal (Dako, Glostrup, Dinamarca), incubado *overnight* à 4°C (1/1000). Anticorpo utilizado para detecção de alterações intersticiais no córtex renal. A proteína α -SMA em rim de roedores adultos é fisiologicamente expressa em células musculares das paredes das artérias e arteríolas renais, porém em condições patológicas, passa a ser expressa em células mesangiais glomerulares e em células intersticiais periglomerulares e peritubulares (BARNES et al., 1999; CAREY, A. V.; CAREY, R. M.; GOMEZ, 1992).
- Anti-VEGF de rato: monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), incubado *overnight* à 4°C (1/40). Anticorpo usado para avaliação da angiogênese no córtex renal.
- Anti-aminopeptidase P (JG12) de camundongo: monoclonal (eBioscience, San Diego, EUA), incubação por 60 min em temperatura ambiente (1/1000). Utilizado como marcador de células endoteliais no córtex renal.
- Anti-eNOS de camundongo: monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), incubação por 60 min em temperatura ambiente (1/200). A eNOs é a principal enzima responsável pela produção de NO derivado do endotélio (FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006).

Após a lavagem em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina (IgG) produzido em camundongo (1/200) (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) no caso do anticorpo primário ter sido monoclonal ou em coelho (1/400) (Vector Laboratories, Burlingame, EUA), no caso do anticorpo primário ter sido policlonal (fibronectina), por 30 min à temperatura ambiente. O produto da reação foi detectado usando um complexo de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) e a cor foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma Chemical Company, St Louis, EUA) e cloreto de níquel, na presença de água oxigenada. A contra-coloração foi realizada com

methylgreen e o material foi desidratado e montado. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pela diluição dos anticorpos primários e secundários com solução de PBS, contendo albumina bovina 1%.

A avaliação dos resultados da imunorreação para desmina, VEGF, fibronectina e JG12 nos glomérulos; VEGF, fibronectina e α -SMA na área tubulointersticial foi realizada determinando um escore médio por área de córtex renal ($0,1 \text{ mm}^2$) (30 campos consecutivos) e por glomérulo (50 glomérulos), para cada animal, usando escores que refletiam a extensão (porcentagem) da área marcada (**Quadro 3**). A análise da imunorreação para ED1 foi feita pela contagem das células positivas (macrófagos) por glomérulo e por área do córtex renal, e posteriormente determinado o número médio de células por campo e por glomérulo para cada rim. A densidade de capilares peritubulares no córtex renal foi estimada por meio da contagem do número de capilares observados por campo. O número médio de capilares peritubulares por $0,1 \text{ mm}^2$ foi obtido após a contagem de 30 campos consecutivos (MACHADO et al., 2012). Os resultados da imunorreação para eNOS nos glomérulos e na região tubulointersticial cortical foram avaliados por medida de porcentagem da área glomerular (30 glomérulos) e da área tubulointersticial no córtex renal (20 campos) positivamente marcadas, utilizando o programa NIH ImageJ software (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, EUA).

4.10 Análises por *Western blot*

As expressões de VEGF, eNOS e podocina foram avaliadas por *Western blot* nas amostras de tecidos renais do córtex e da medula externa renal dos animais, 60 dias após a administração de SAL ou ADR. As amostras foram homogeneizadas em 2 mL de tampão de lise: Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), Triton X-100 (1%), dodecil sulfato de sódio (SDS; 0,1%), aprotinina (1 $\mu\text{g/mL}$), leupeptin (1 $\mu\text{g/mL}$), fluoreto fenilmetilsulfonil (1 mM), ortovanato de sódio (1 mM, pH 10), pirofosfato de sódio (1 mM), fluoreto de sódio (25 mM), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA 0,001 M, pH 8), à 4°C por 15 min à 10000 rpm.

Amostras do sobrenadante do lisado renal, contendo 30 µg de proteína, foram solubilizadas em tampão de amostra: Tris-HCl (62,5 mM, pH 6,8), glicerol (10%), SDS (2%), β-mercaptoetanol (5%) e azul de bromofenol; aquecidas à 100°C por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida à 10%. A dosagem de proteína nas amostras foi realizada pelo método de Bradford (1976). As amostras contendo proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitocelulose, sendo as membranas incubadas por 2 h em 30 mL de tampão de bloqueio [TPBSt: trizma base (0,05 M), NaCl (0,15 M), *tween* 20 (pH 7,6) e leite desnatado (5%)]. Em seguida, as membranas foram lavadas em tampão TBSt e incubadas *overnight* à 4°C com os anticorpos primários: anti-VEGF de rato [monoclonal (1/250), Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA], anti-eNOS de coelho [policlonal (1/500), Cell Signaling Technology, Danvers, EUA], anti-podocina de coelho [policlonal (1/500), Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA] e anti-α1-tubulina [monoclonal (1/4000), Sigma Chemical Company, St Louis, EUA], como referência. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBSt e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (1/10000; Dako, Glostrup, Dinamarca) ou anti-IgG de coelho (1/5000; Dako, Glostrup, Dinamarca), por 1 h em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente e o resultado da reação detectado pelo Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Chemical, Rockford, EUA) e capturado por programa de imagem (Molecular Imaging Systems, Eastman Kodak Company, Rochester, EUA). A análise da densitometria das bandas foi realizada pelo programa NIH Image J software (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, EUA) e os resultados expressos como porcentagem em relação ao grupo controle CNT, que foi indicado como 100%.

4.11 Quantificação da concentração de interleucina (IL)-1β em tecido renal

Fragmentos do córtex e da medula externa renal dos animais foram homogeneizados em tampão de lise: Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), Triton X-100 (1%), dodecil sulfato de sódio (SDS; 0,1%), aprotinina (1 µg/mL), leupeptin (1 µg/mL), fluoreto de fenilmetilsulfonil (1 mM), ortovanato de sódio (1mM,

pH 10), pirofosfato de sódio (1 mM), fluoreto de sódio (25 mM), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA 0,001 M, pH 8), à 4°C por 15 min à 10000 rpm. Em seguida, A quantificação de IL-1 β no sobrenadante foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA), utilizando kit comercial (R&D Systems Inc, Minneapolis, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A dosagem de proteínas nas amostras foi realizada pelo método de Bradford (1976). Os valores de IL-1 β foram expressos em pg/mg de proteína.

4.12 Análise estatística

Para a comparação entre dois grupos, utilizou-se o Teste T não paramétrico com correção de Welch e Teste T paramétrico para comparação intra-grupo. A Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls foi utilizada para as variáveis cujos resíduos foram normalmente distribuídos [peso corporal, fração de excreção de potássio (FE K⁺), ED1, eNOS, VEGF (*Western blot*), podocina e JG12 (tubulointersticial)] ou que mostraram uma distribuição normal após a transformação em log_e dos dados [creatinina plasmática (P_{creat}), TFG, fração de excreção de sódio (FE Na⁺), albuminúria, MCP-1 e TGF- β) e os resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A normalidade dos resíduos e homocedasticidade de variâncias foram investigadas por meio dos gráficos de normalidade e de dispersão entre os resíduos em comparação com os valores observados (BARKER; SHAW, 2015). Para os dados em que os resíduos não foram normalmente distribuídos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas, com resultados expressos em mediana e intervalos interquartis (25-75%). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa STATISTICA versão 10 (StatSoft, Tulsa, EUA). Os gráficos foram construídos utilizando GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, EUA). O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Peso corporal

Durante a realização do primeiro teste de Vmax e da Pr, não houve diferença estatística no peso corporal entre os grupos Sedentários e Treinados ($129,4 \pm 4,61$ g e $143,1 \pm 4,89$ g, respectivamente). No início e na primeira semana do treinamento físico prévio, observou-se diferença de ganho médio de peso corporal entre os dois grupos. Porém, nas semanas subsequentes, o ganho de peso entre os grupos foi similar até o fim do protocolo de atividade física (**Figura 3A**). No dia do segundo teste para verificação da Vmax e da Pr, não foi observada diferença entre a média de peso corpóreo entre os grupos Sedentários ($437,3 \pm 10,97$ g) e Treinados ($434,8 \pm 8,52$ g). Após a administração de SAL ou ADR, houve redução do peso corporal dos grupos que receberam ADR (ADNT e ADT) em relação aos seus respectivos controles (CNT e CT, respectivamente), nos períodos mais tardios (45º e 60º dias) (**Figura 3B**).

Figura 3 – Peso corporal dos grupos Sedentários (n=13) e Treinados (n=14) durante o período de treinamento físico prévio (A) e peso corporal dos animais dos grupos: Controle Não Treinado (CNT) (n=6), Controle Treinado (CT) (n=6), Adriamicina Não Treinado (ADNT) (n=7) e Adriamicina Treinado (ADT) (n=8), após a administração de salina (SAL) ou adriamicina (ADR) (B). Os pontos representam as médias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ versus Sedentários em (A); * $p < 0,05$ versus CNT e § $p < 0,05$ versus ADNT em (B).

5.2 Velocidade da MFEL e avaliação da capacidade aeróbia

A velocidade média para início do treinamento físico encontrada após a realização da MFEL foi de $18,64 \pm 1,1$ m/min para o grupo Sedentários e $18,61 \pm 0,95$ m/min para o grupo Treinados. Posteriormente ao teste de MFEL, somente o grupo Treinados realizou o treinamento físico. Os dados referentes à capacidade aeróbia dos animais sedentários não foram demonstrados, já que nove ratos deste grupo (69,2%) recusaram-se a correr na esteira rolante durante a realização do segundo teste de Vmax e da Pr. A Vmax e a distância percorrida dos animais do grupo Treinados não foram alteradas entre o primeiro e o segundo teste para estimativa da Vmax e da Pr (**Figura 4 e Figura 5**), porém verificou-se ganho de peso corporal entre o período de realização dos dois testes (ganho médio de 0,28 Kg) e aumento de desempenho aeróbio destes animais, proporcionado pelo treinamento físico (**Figura 6**).

Figura 4 – Velocidade máxima (Vmax) dos animais do grupo Treinados (n=14) antes do treinamento físico (Pré-treinamento) e quatro semanas após a corrida em esteira rolante (Pós-treinamento).

Figura 5 – Distância percorrida pelos animais do grupo Treinados (n=14) durante dois períodos: primeiro teste progressivo para estimativa da Vmax e da Pr, realizado previamente ao programa de treinamento físico (Pré-treino); e segundo teste progressivo para estimativa da Vmax e da Pr, feito após quatro semanas de corrida em esteira rolante (Pós-treino).

Figura 6 – Desempenho aeróbio dos animais do grupo Treinados (n=14) antes do treinamento físico (Pré-treino) e quatro semanas após a corrida em esteira rolante (Pós-treino). **p<0,01 versus Pré-treino.

5.3 Função renal

A **Tabela 1** apresenta os parâmetros funcionais renais dos animais 60 dias após administração de SAL ou ADR. Elevação da creatinina plasmática e redução da taxa de filtração glomerular foram observadas no grupo ADNT. O treinamento físico prévio preveniu estas alterações. Não houve diferença no volume urinário, osmolalidade urinária, fração de excreção de sódio e potássio dos diferentes grupos.

Tabela 1 – Parâmetros funcionais dos animais dos grupos controles e experimentais, 60 dias após as injeções e.v. de salina ou adriamicina.

	CNT	CT	ADNT	ADT
Pcreat (mg/dL)	0,50±0,01	0,52± 0,03	1,43±0,17*	0,78±0,12 [#]
TFG (mL/min/100g)	0,41±0,01	0,42±0,07	0,23±0,01**	0,35±0,04 [#]
VU (mL/24h)	16,0 (13,3; 18,0)	11,6 (9,8; 16,0)	22,5 (15,5; 41,3)	18,5 (10,2; 26;5)
Uosm (mOsm/kgH₂O)	1426 (1219;1861)	1655 (1464;1883)	1209 (647;1329)	1273 (696;1707)
FE_{Na}⁺(%)	0,18±0,06	0,19±0,04	0,36±0,08	0,21±0,06
FE_K⁺(%)	19,75±1,52	23,25±3,39	34,86±4,77	28,14±5,48

CNT= Controle não Treinado (n=6), CT= Controle Treinado (n=6), ADNT= Adriamicina não Treinado (n=7), ADT= Adriamicina Treinado (n=8); P_{creat}= creatinina plasmática; TFG= taxa de filtração glomerular; VU= volume urinário; U_{osm}= osmolalidade urinária; FE_{Na}⁺= fração de excreção de sódio; FE_K⁺= fração de excreção de potássio. P_{creat}, TFG, FE_K⁺ e FE_{Na}⁺ estão expressos em média±SEM. A U_{osm} e a VU estão expressas como mediana e percentis (25%; 75%). *p<0,05 e **p<0,01 em comparação com o grupo CNT, [#]p<0,05 em comparação com o grupo ADNT.

5.4 Albuminúria

Ambos os grupos de animais experimentais apresentaram um aumento significativo da excreção urinária de albumina no 7º, 30º e 60º dias após a administração de ADR em relação aos seus grupos controles, porém esta elevação foi menos intensa nos animais submetidos à atividade física prévia no 7º e 30º dias após o tratamento. No 60º dia, observou-se uma tendência à redução da albuminúria no grupo ADT em relação ao grupo ADNT (**Figura 7**).

Figura 7 – Excreção urinária de albumina (Ualb) nos grupos controles e experimentais, (A) sete dias após administração de SAL ou ADR; (B) 30 dias após injeção de SAL ou ADR; (C) 60 dias após administração de SAL ou ADR. CNT= controle não treinado (n=6), CT= controle treinado (n=6), ADNT= adriamicina não treinado (n=7), ADT= adriamicina treinado (n=8). Os dados estão expressos em média ± SEM. **p<0,01 versus CNT; §p<0,05 e §§p<0,01 versus CT; #p<0,05 versus ADNT.

5.5 Excreção urinária de MCP-1 e TGF- β

A excreção urinária de MCP-1 e TGF- β foi maior nos animais que receberam ADR em comparação com os grupos controles. No entanto, o aumento de MCP-1 na urina foi menos intenso nos animais que realizaram treinamento físico prévio à administração de ADR. Houve uma tendência à redução das alterações de excreção urinária de TGF- β no grupo ADT em relação ao grupo ADNT (**Figura 8**).

Figura 8 – Excreção urinária de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) (A) e TGF- β (*transforming growth factor β*) (B), nos grupos controles e experimentais. CNT= controle não treinado (n=6), CT= controle treinado (n=6), ADNT= adriamicina não treinado (n=7), ADT= adriamicina treinado (n=8). Os dados estão expressos em média $\pm$ SEM. **p<0,01 versus CNT; §p<0,05 e §§p<0,01 versus CT; #p<0,05 versus ADNT.

5.6 Avaliação histológica

Os resultados referentes à avaliação histológica do córtex renal estão apresentados na **Figura 9**. A presença de lesões glomerulares com expansão da área mesangial e alargamento da área intersticial com infiltrado inflamatório e fibrose foi observada no córtex renal dos animais tratados com ADR. A análise morfométrica revelou que houve aumento da área intersticial relativa do córtex renal em ambos os grupos tratados com ADR, que foi menos intenso nos animais do grupo ADT.

Figura 9 – Secções histológicas coradas com Tricrômio de Masson representativas dos grupos CNT (A), CT (B), ADNT (C), ADT (D). Note que as lesões túbulointersticiais são mais intensas em (C) do que em (D). A barra indica 20 μ m. Escore para lesão glomerular (E) e área intersticial relativa (F) dos grupos Controle não Treinado (CNT) (n=6), Controle Treinado (CT) (n=6), Adriamicina não Treinado (ADNT) (n=7) e Adriamicina Treinado (ADT) (n=8), 60 dias após administração de SAL ou ADR. Os dados estão expressos como mediana e percentis (25%; 75%) em (E) e como média $\pm$ SEM em (F). **p<0,01 versus CNT; §§p<0,01 versus CT; ##p<0,01 versus ADNT.

5.7 Análise imuno-histoquímica

A avaliação da expressão de desmina foi realizada 60 dias após a administração de SAL ou ADR no intuito de analisar a integridade dos processos podais das células epiteliais dos glomérulos renais dos animais. A desmina é um marcador sensível de lesão dos processos podais. O treinamento físico prévio atenuou a elevação da expressão de desmina na região periférica do tufo glomerular observada nos animais tratados com ADR (**Figura 10**).

A imunolocalização de células ED1 positivas evidenciou aumento do número de macrófagos (**Figura 11**) nos glomérulos e no córtex renal em ambos os grupos de animais que receberam ADR. Contudo, o pré-condicionamento físico reduziu esse aumento induzido pela administração de ADR.

A **Figura 12** ilustra a imunomarcação para fibronectina no córtex renal. Elevação significativa da expressão de fibronectina foi observada nos glomérulos do grupo ADNT e na região tubulointersticial do córtex renal em ambos os grupos de animais tratados com ADR. Contudo, o aumento da expressão deste marcador na área tubulointersticial do córtex renal foi menor nos animais do grupo ADT em relação ao observado nos animais do grupo ADNT.

A imunolocalização para α -SMA (**Figura 13**) evidenciou aumento da reação no córtex renal dos animais do grupo ADNT em relação aos do grupo controle. Este aumento não foi observado nos animais tratados com ADR que foram submetidos ao treinamento físico prévio.

Análise da expressão de VEGF e eNOS está apresentada nas **Figuras 14 e 15**, respectivamente. Foram observadas reduções de ambos os marcadores nos glomérulos e na área tubulointersticial dos grupos de animais tratados com ADR. A atividade física prévia foi capaz de atenuar estas alterações no compartimento tubulointersticial.

Os resultados referentes à quantificação por escore da área glomerular preenchida por capilares glomerulares e ao número de capilares peritubulares no córtex renal, avaliados pela expressão de aminopeptidase P (JG12) (**Figura 16**), mostraram que houve redução da expressão deste marcador nos glomérulos e diminuição significativa do número de capilares peritubulares corticais nos animais expostos à ADR. No entanto, a redução do número de capilares peritubulares foi menor no córtex renal dos animais que realizaram exercício físico prévio à administração de ADR.

Figura 10 – Imuno-histoquímica para desmina nos glomérulos dos grupos (A) CNT, (B) CT, (C) ADNT e (D) ADT. Observar que a expressão de desmina na região periférica do tufo glomerular é maior em (C) do que em (D). A barra indica 20 μ m. Escore para desmina na periferia glomerular (E), 60 dias após administração de SAL ou ADR. CNT - Controle não Treinado (n=6); CT - Controle Treinado (n=6); ADNT - Adriamicina não Treinado (n=7); ADT - Adriamicina Treinado (n=8). Os dados estão expressos como mediana e percentis (25%; 75%) em (E). **p<0,01 *versus* CNT; §p<0,05 *versus* CT; #p<0,05 *versus* ADNT.

Figura 11 – Imunolocalização de células ED1-positivas (macrófagos) no córtex renal em (A) CNT, (B) CT, (C) ADNT e (D) ADT e quantificação nos glomérulos (E) e no compartimento túbulointersticial (F) dos grupos Controle não Treinado (CNT) (n=6), Controle Treinado (CT) (n=6), Adriamicina não Treinado (ADNT) (n=7) e Adriamicina Treinado (ADT) (n=8), 60 dias após administração de SAL ou ADR. A barra indica 20 μ m. Resultados expressos em média $\pm$ SEM. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ versus CNT; § $p<0,05$ versus CT; # $p<0,05$ versus ADNT.

Figura 12 – Imunolocalização de fibronectina no córtex renal dos grupos (A) CNT, (B) CT, (C) ADNT e (D) ADT. A barra indica 20 μ m. Escore para fibronectina nos glomérulos (E) e na região tubulointersticial do córtex renal (F) dos grupos Controle não Treinado (CNT) (n=6), Controle Treinado (CT) (n=6), Adriamicina não Treinado (ADNT) (n=7) e Adriamicina Treinado (ADT) (n=8), 60 dias após administração de SAL ou ADR. Os dados estão expressos como mediana e percentis (25%; 75%). *p < 0,05 e **p < 0,01 *versus* CNT; §§p < 0,01 *versus* CT; #p < 0,05 *versus* ADNT.

Figura 13 – Imunorreação para α -SMA no córtex renal nos grupos (A) CNT, (B) CT, (C) ADNT e (D) ADT. A barra indica 20 μ m. Escore para α -SMA na área tubulointersticial do córtex renal em (E), 60 dias após administração de SAL ou ADR. CNT - Controle não Treinado (n=6); CT - Controle Treinado (n=6); ADNT - Adriamicina não Treinado (n=7); ADT - Adriamicina Treinado (n=8). Os dados estão expressos como mediana e percentis (25%; 75%) em (E). **p<0,01 versus CNT.

Figura 14 – Imunolocalização para VEGF no córtex renal dos animais dos grupos (A) CNT, (B) CT, (C) ADNT e (D) ADT. A barra indica 20 μ m. Escore para a expressão de VEGF por glomérulo (E) e na região tubulointersticial dos grupos controles e experimentais, 60 dias após a administração de SAL ou ADR. CNT - Controle não Treinado (n=6); CT - Controle Treinado (n=6); ADNT - Adriamicina não Treinado (n=7); ADT - Adriamicina Treinado (n=8). Os dados estão expressos como mediana e percentis (25%; 75%). *p < 0,05 e **p < 0,01 versus CNT; §p < 0,05 versus CT; #p < 0,05 versus ADNT.

Figura 15 – Imunolocalização para eNOS no córtex renal dos animais dos grupos (A) CNT, (B) CT, (C) ADNT e (D) ADT. A barra indica 20 μ m. Porcentagem da área glomerular (E) e da área tubulointersticial (F) ocupadas por marcação positiva para eNOS, 60 dias após a administração de SAL ou ADR. CNT - Controle não Treinado (n=6); CT - Controle Treinado (n=6); ADNT - Adriamicina não Treinado (n=7); ADT - Adriamicina Treinado (n=8). Resultados expressos em média $\pm$ SEM. **p<0,01 versus CNT; §p<0,05 e §§p<0,01 versus CT; #p<0,05 versus ADNT.

Figura 16 – Imunorreação para JG12 no córtex renal dos animais dos grupos (A) CNT, (B) CT, (C) ADNT e (D) ADT. A barra indica 20 μ m. Escore para a expressão de JG12 por glomérulo (E) e número de capilares peritubulares corticais em (F), 60 dias após a administração de SAL ou ADR. CNT - Controle não Treinado (n=6); CT - Controle Treinado (n=6); ADNT - Adriamicina não Treinado (n=7); ADT - Adriamicina Treinado (n=8). Os dados estão expressos como mediana e percentis (25%; 75%) em (E) e como média $\pm$ SEM em (F). *p < 0,05 e **p < 0,01 versus CNT; §p < 0,05 e §§p < 0,01 versus CT; ##p < 0,05 versus ADNT.

5.8 Análises por *Western blot*

As expressões de podocina, VEGF e eNOS no tecido renal também foram avaliadas por *Western blot* (**Figuras 17, 18 e 19**, respectivamente). As expressões de podocina e de eNOs estavam diminuídas em ambos os grupos de animais que receberam ADR. Contudo, o pré-condicionamento físico atenuou estas alterações. Os resultados mostraram também que houve redução da expressão de VEGF no grupo ADNT em relação ao seu grupo controle (CNT) e em relação ao grupo ADT. O treinamento físico preveniu esta redução.

Figura 17 – Expressão de podocina avaliada por *Western blot* no tecido renal (A) dos animais dos grupos CNT (banda 1), CT (banda 2), ADNT (banda 3) e ADT (banda 4), 60 dias após administração de SAL ou ADR. (B) Análise da densitometria das bandas de podocina. A razão densitométrica entre as bandas de podocina e de α_1 -tubulina foi calculada e os dados foram expressos em comparação ao grupo controle (CNT), com o valor médio designado como 100%. CNT - Controle não Treinado (n=5); CT - Controle Treinado (n=5); ADNT - Adriamicina não Treinado (n=6); ADT - Adriamicina Treinado (n=6). **p<0,01 *versus* CNT; §p<0,05 *versus* CT; #p<0,05 *versus* ADNT.

Figura 18 – Expressão de VEGF avaliada por *Western blot* no córtex renal e na medula externa (A) dos animais dos grupos CNT (banda 1), CT (banda 2), ADNT (banda 3) e ADT (banda 4), 60 dias após administração de SAL ou ADR. (B) Análise da densitometria das bandas de VEGF. A razão densitométrica entre as bandas de VEGF e de α_1 -tubulina foi calculada e os dados foram expressos em comparação ao grupo controle (CNT), com o valor médio designado como 100%. CNT - Controle não Treinado (n=5); CT - Controle Treinado (n=5); ADNT - Adriamicina não Treinado (n=6); ADT - Adriamicina Treinado (n=7). **p<0,01 versus CNT; #p<0,05 versus ADNT.

Figura 19 – Expressão de eNOS avaliada por *Western blot* no córtex renal e na medula externa (A) dos animais dos grupos CNT (banda 1), CT (banda 2), ADNT (banda 3) e ADT (banda 4), 60 dias após administração de SAL ou ADR. (B) Análise da densitometria das bandas de eNOS. A razão densitométrica entre as bandas de eNOS e de α_1 -tubulina foi calculada e os dados foram expressos em comparação ao grupo controle (CNT), com o valor médio designado como 100%. CNT - Controle não Treinado (n=5); CT - Controle Treinado (n=5); ADNT - Adriamicina não Treinado (n=6); ADT - Adriamicina Treinado (n=7). **p<0,01 versus CNT; §p<0,05 versus CT; ##p<0,01 versus ADNT.

5.9 Quantificação de IL-1 β no tecido renal

A quantificação de IL-1 β no tecido renal por ELISA evidenciou aumento dos níveis desta citocina no córtex e medula externa renal nos ratos que receberam ADR, no entanto o treinamento físico prévio foi capaz de reduzir esta elevação (Figura 20).

Figura 20 – Níveis de IL-1 β no córtex e medula externa renal dos animais dos grupos CNT (n=6), CT (n=6); ADNT (n=7) e ADT (n=8), 60 dias após administração de SAL ou ADR. Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. CNT - Controle não Treinado; CT - Controle Treinado; ADNT - Adriamicina não Treinado; ADT - Adriamicina Treinado (n=6). **p<0,01 *versus* CNT; §p<0,05 *versus* CT; #p<0,05 *versus* ADNT.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a influência do treinamento físico prévio na evolução da lesão renal induzida por ADR em ratos. Os animais realizaram quatro semanas de corrida em esteira rolante e posteriormente receberam uma dose única e.v. de ADR. Eles foram acompanhados desde o início do treinamento físico até 60 dias após a administração do quimioterápico. Nas primeiras semanas de atividade física, o peso corporal do grupo de animais em treinamento era maior do que o grupo de animais sedentários, porém o ganho de massa corporal tornou-se semelhante entre os dois grupos nas duas semanas finais de treinamento físico. Estudos que utilizaram protocolos de treinamento aeróbio (natação e corrida em esteira rolante) com períodos maiores (oito a doze semanas) evidenciaram redução do peso corporal dos animais treinados em relação aos animais sedentários (MOURÃO et al., 2014; PASSOS et al., 2016; SCARIOT et al., 2016). Vários estudos têm mostrado que a atividade física é capaz de provocar alterações do peso corporal e adaptações metabólicas tanto em animais quanto em humanos (DROSTE et al., 2007; MELZER et al., 2016; MOURÃO et al., 2014; PASSOS et al., 2016). O modelo de treinamento realizado neste estudo utilizou duas intensidades de estímulo (END1 e END2) com o objetivo de obter o desenvolvimento da capacidade aeróbia (DE ARAÚJO et al., 2012) e o período de quatro semanas de treinamento físico foi adequado para melhora do desempenho aeróbio dos animais, conforme verificado nos resultados do teste progressivo para estimativa da Pr.

Os animais apresentaram redução de peso corporal após a administração de ADR em relação aos grupos controles nos períodos mais tardios. Estes resultados estão de acordo com experimentos realizados por outros pesquisadores (ESCRIBANO et al., 2014; ULU et al., 2008). A perda de massa corporal é uma das características associadas à citotoxicidade provocada pela ADR (BERTANI et al., 1982; DEEPA; VARALAKSHMI, 2005).

A avaliação da função renal pelos níveis de creatinina plasmática e pela TFG evidenciou elevação da creatinina plasmática e queda da TFG nos animais que receberam ADR. Contudo, o treinamento físico prévio foi capaz de prevenir estas alterações. Os efeitos benéficos do pré-condicionamento físico na redução da creatinina plasmática também foram observados em modelos de lesão renal provocada pela isquemia e reperfusão renal e de nefropatia diabética induzida por estreptozotocina (LEE; PARK; KIM, 2013; SILVA et al., 2012). A prática da atividade física está também associada com a melhora da função renal após o

desenvolvimento de doença renal progressiva (HAWKINS et al., 2011; ROBINSON-COHEN et al., 2014). Em um estudo de coorte realizado com pacientes que possuíam doença renal progressiva foi observado que níveis elevados de atividade física estavam relacionados com menor redução da TFG nestes indivíduos (ROBINSON-COHEN et al., 2014). Chen et al. (2014) observaram que o ritmo de filtração glomerular foi restaurado aos valores próximos aos normais, em ratos que realizaram treinamento aeróbio (natação ou corrida em esteira rolante) durante onze semanas após exposição à ADR. No presente estudo, não foi observada variação de volume urinário, osmolalidade urinária, fração de excreção de sódio e fração de excreção de potássio entre os grupos controles e experimentais.

Os resultados deste estudo mostraram também que o pré-condicionamento físico atenuou significativamente o aumento dos níveis de albumina na urina dos animais no primeiro mês após a administração de ADR e promoveu tendência à diminuição aos 60 dias após a administração desse quimioterápico. Considerando este achado, foram analisados os efeitos do exercício físico prévio nos componentes da barreira de filtração, utilizando os marcadores: aminopeptidase P, desmina e podocina. Os animais expostos à ADR apresentaram expressão reduzida de aminopeptidase P e podocina no córtex renal e aumentada de desmina na periferia do tufo glomerular. A aminopeptidase P é um marcador de endotélio vascular e no rim sua expressão é observada especificamente nas células endoteliais glomerulares e tubulointersticiais (SUN et al., 2012). A desmina é normalmente expressa somente em células mesangiais, sendo a expressão desse marcador na região periférica do tufo glomerular relacionada com a lesão dos processos podais (COIMBRA et al., 2000). A podocina é uma proteína de membrana, expressa normalmente nas células dos processos podais (BOUTE et al., 2000; SCHWARZ et al., 2001). Camundongos deficientes de podocina desenvolvem proteinúria maciça e morrem dias após o nascimento por alterações precoces da barreira de filtração glomerular (ROSELLI et al., 2004). Alterações na expressão de desmina e podocina associadas com a lesão de podócitos na nefropatia por ADR foram observadas em outros estudos (FRANCESCATO et al., 2011; WANG; LIU; SUN, 2013). Agrawal et al. (2013) constataram que a redução da expressão de podocina está relacionada com a severidade da proteinúria na glomeruloesclerose segmentar e focal. No presente estudo, o pré-condicionamento físico não reduziu a perda de células endoteliais glomerulares, mas atenuou a expressão de desmina na região periférica

do tufo glomerular e a redução da expressão de podocina no córtex renal dos animais que receberam ADR, evidenciando o efeito protetor da atividade física na lesão dos processos podais induzida pela ADR. A redução da lesão dos podócitos pode explicar a melhora da TFG e a redução da albuminúria observada nestes animais, uma vez que os podócitos participam da barreira de filtração glomerular e que a sua perda pode provocar redução da seletividade do processo de filtração glomerular (SHANKLAND, 2006; WANG; LIU; SUN, 2013).

Evidências experimentais demonstraram que a proteinúria participa ativamente na lesão tubulointersticial observada no modelo de nefropatia por ADR (BARONI et al., 1999; BARONI et al., 2000). Cianciolo et al. (2013) investigaram os processos moleculares envolvidos na lesão renal provocada pela albuminúria por meio de biomarcadores urinários e constataram que a albuminúria severa precede as lesões dos túbulos renais em animais injetados com ADR. Proteínas filtradas podem ser tóxicas para as células tubulares (GALLI et al., 2001). Diversos estudos experimentais demonstraram que a exposição de células dos túbulos proximais a diferentes proteínas, como albumina, transferrina e IgG, induz o aumento da produção de substâncias vasoativas e citocinas por estas células, como exemplo, o MCP-1, promovendo infiltração de células inflamatórias no compartimento intersticial (ZOJA; BENIGNI; REMUZZI, 2004; TANG et al., 2002; ZOJA et al., 1995; ZOJA et al., 1998). No presente estudo foi constatada a elevação do número de macrófagos no córtex renal dos animais tratados com ADR, sendo menos intensa nos animais exercitados. A redução destas células inflamatórias no córtex renal esteve associada com a diminuição da expressão de IL-1 β no córtex e medula externa e dos níveis urinários de MCP-1 nestes animais. A prática de atividade física está relacionada com a redução da inflamação em patologias renais e não renais. A diminuição da infiltração de macrófagos e da expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-16 e TNF- α , foi observada em tecido aórtico em modelos animais de aterosclerose diabética e de inflamação nas artérias em ratos idosos que realizaram exercício aeróbio (KADOGLU et al., 2013; LESNIEWSKI et al., 2011). Miyagi et al. (2014) constataram que o pré-condicionamento físico foi capaz de atenuar a lesão renal aguda induzida por cisplatina ao reduzir a produção local de IL-16 e elevar a produção de uma enzima antioxidante, a heme oxigenase-1 (HO-1), atenuando desta forma, o processo inflamatório renal.

O MCP-1 é uma citocina importante na regulação da migração e ativação de macrófagos/monócitos, agindo por meio da ligação com o receptor CCR2. (DESHMANE et al., 2009; KITAGAWA et al., 2004). Várias evidências experimentais mostram que o MCP-1 urinário resulta da sua produção renal e não do plasma (MORIIA et al., 2003; WADA et al., 1996). Em um estudo realizado por Eardley et al. (2006) foi observado uma associação entre os níveis de MCP-1 urinário, a albuminúria e o número de macrófagos intersticiais em pacientes com doença renal progressiva. No presente estudo, a redução dos marcadores de inflamação nos animais que realizaram treinamento físico prévio à injeção de ADR também esteve relacionada à atenuação da albuminúria observada já na primeira semana após a administração deste quimioterápico.

Nos glomérulos, também foi constatado aumento do número de macrófagos nos grupos de animais que receberam ADR em relação aos grupos controles, que foi menor nos animais que realizaram treinamento físico prévio. No entanto, essas alterações foram discretas. Pequenas alterações na quantidade de macrófagos nos glomérulos foram encontradas também em estudos que utilizaram este modelo de desenvolvimento de doença renal progressiva (FRANCESCATO et al., 2011; HE et al., 2011). Lee e Harris (2011) constataram que no modelo de nefropatia induzida por ADR, a infiltração de macrófagos é mais intensa na região túbulointersticial do córtex renal, sendo discreta nos glomérulos. Contudo, foram detectadas, no estudo histológico realizado no presente estudo, lesões glomerulares caracterizadas principalmente pela expansão de matriz mesangial em ambos os grupos de animais tratados com ADR. Um dos possíveis mecanismos responsáveis por este evento é a desorganização estrutural do citoesqueleto, com perda de podócitos e produção da citocina pro-fibrótica TGF- β pelas células mesangiais (FINER et al., 2012; POZZI, 2012). O aumento dos níveis urinários de TGF- β observado nesses animais confirma esta hipótese.

O acúmulo de matriz extracelular possui estreita relação com a progressão da doença renal e reflete a fibrose tecidual (EDDY, 2014; MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2016). Portanto, os efeitos do exercício físico sobre este aspecto foram também avaliados nesse estudo. Nos glomérulos, os estudos histológicos não evidenciaram diferença estatística entre as lesões dos grupos de animais tratados com ADR. No entanto, elevação da expressão de fibronectina foi observada apenas nos glomérulos do grupo ADNT em relação ao seu respectivo grupo controle (CNT).

As avaliações morfológicas e imuno-histoquímicas evidenciaram aumento da área intersticial relativa e da expressão de fibronectina na região tubulointersticial do córtex renal dos animais tratados com ADR. Estas alterações foram menos intensas nos animais submetidos ao pré-treinamento físico. A fibronectina é a primeira proteína de matriz intersticial a ser depositada no processo de fibrogênese, atuando como âncora para a deposição de outras proteínas, além de ter efeito quimiotático para fibroblastos (EDDY, 1996; SHUI et al., 2006). Amaral et al. (2016) demonstraram que a atividade física prévia e posterior à indução de diabetes em ratos reduziu a expressão de fibronectina nos glomérulos e associaram este achado com a diminuição da expressão de TGF- β nos rins destes animais.

Expressão elevada de TGF- β é uma característica comumente observada nos rins de roedores com nefropatia induzida por ADR (BARONI et al., 2000; PENG et al., 2012; XU, Yixiao et al., 2016). Finer et al. (2012) demonstraram que o TGF- β é um dos principais mediadores da expansão da matriz extracelular observada nos glomérulos e nos túbulos renais neste modelo, utilizando um inibidor do receptor de TGF- β . Evidências experimentais indicam que os níveis urinários de TGF- β refletem sua síntese renal e não plasmática (FREITAS et al., 1998; NOH; WIGGING; PHAN, 1993). No presente estudo, houve elevação dos níveis urinários de TGF- β em ambos os grupos que receberam ADR, sendo verificada uma tendência à atenuação desta alteração nos animais que realizaram treinamento físico prévio.

Em patologias renais associadas com proteinúria, as células tubulares renais passam por um processo de transdiferenciação, modificando sua função e seu fenótipo, passando a produzir substâncias inflamatórias, mediadores fibrogênicos (TGF- β) e proteínas constituintes da matriz extracelular, como colágeno tipo I, tipo IV e fibronectina, após a captação de proteínas (ABBATE; ZOJA; REMUZZI, 2006; ABE et al., 2004; BURTON et al., 1996; ZOJA; ABBATE; REMUZZI, 2015). Além disso, o próprio TGF- β pode estimular a transdiferenciação de vários tipos de células, como células tubulares e fibroblastos ativados, que por sua vez, começam a expressar α -SMA, tornando-se capazes de elevar a produção de componentes da matriz extracelular (SEBE et al., 2008; LIU, 2011). No presente estudo, foi observada elevação da expressão de α -SMA apenas no grupo que recebeu ADR e que não realizou treinamento físico prévio.

Aumento da área intersticial relativa cortical foi detectado já no sétimo dia, após administração de ADR com elevações progressivas no 14º e 28º dias em

camundongos (KAIRAITIS et al., 2005). Peng et al. (2012), utilizando um protocolo de natação como atividade aeróbia, durante 11 semanas após a administração de ADR em ratos, observaram redução da deposição de colágeno no interstício cortical renal destes animais e supressão da transdiferenciação em miofibroblastos das células mesangiais. No presente estudo, a redução de alterações da área intersticial relativa e da expressão de fibronectina no córtex renal dos animais submetidos ao treinamento físico prévio à injeção de ADR estava associada com a diminuição de marcadores inflamatórios e níveis urinários de MCP-1 (GLASSOCK, 2016; WANG et al., 2016; WYNN, 2008). A ausência de diferença estatisticamente significativa da expressão de α -SMA entre os animais previamente treinados à administração de ADR e seu respectivo grupo controle (CNT), associada com a tendência de diminuição dos níveis urinários de TGF- β nos animais do grupo ADT em relação aos animais do grupo ADNT podem ter contribuído para a menor deposição de matriz extracelular no córtex renal nestes animais. Além disso, as reduções das alterações da expressão de VEGF e eNOS nos animais que realizaram exercício aeróbio prévio à lesão por ADR devem estar contribuindo também para a diminuição das lesões tubulointersticiais.

As disfunções endoteliais são características relevantes da doença renal progressiva, sendo as alterações da expressão de VEGF e a redução da biodisponibilidade de NO, eventos importantes relacionados com estas disfunções (FUTRAKUL et al., 2008; GOLIGORSKY, 2015; KANG et al., 2002; LEE et al., 2016). O VEGF configura-se como um potente fator angiogênico e o NO derivado do endotélio, produzido pela eNOS, participa também da angiogênese e remodelação vascular (FERRARA; KERBEL, 2005; MORAES et al., 2014). As disfunções endoteliais podem resultar em perda da microvasculatura renal (KANG et al., 2002; PERRY; OKUSA, 2016). No presente estudo, verificou-se redução do número de capilares peritubulares e da expressão do marcador aminopeptidase P nos glomérulos dos animais que receberam ADR, evidenciando diminuição de capilares glomerulares. A diminuição da expressão de VEGF e de eNOS nos glomérulos e na área tubulointersticial do córtex renal destes animais também foi detectada. A redução de VEGF no modelo de nefropatia induzida por ADR foi demonstrada já nas primeiras semanas após administração deste quimioterápico (FAN et al., 2009; KAIRAITIS et al., 2005). Em estudo realizado por Kairaitis et al (2005) foi observado

que a perda de capilares peritubulares foi secundária à diminuição da expressão de VEGF.

Os resultados do presente estudo mostram que o treinamento físico prévio reduz a perda do número de capilares peritubulares no córtex renal dos animais que foram tratados com ADR. A menor redução das expressões de VEGF e da eNOS observada no córtex renal destes animais pode ser responsável por este efeito. Em um modelo de doença renovascular crônica em porcos, a infusão de VEGF reduziu a rarefação da microvasculatura renal e promoveu neovascularização no córtex e medula renal destes animais (CHADE et al., 2016). Em outro estudo, no qual foi utilizado o modelo de nefrectomia 5/6 em ratos, a administração de VEGF protegeu o endotélio dos capilares peritubulares e aumentou a densidade capilar, sugerindo que o VEGF possui participação importante na angiogênese e na manutenção do endotélio vascular (KANG et al., 2001c). Evidências experimentais têm demonstrado que o treinamento físico eleva os níveis circulantes e teciduais de VEGF, melhorando a função endotelial em doenças isquêmica, cardíaca e hipertensiva (FERNANDES et al., 2012; GAO et al., 2014; SILVA Jr et al., 2014).

O treinamento físico prévio atenuou também a redução da expressão de eNOS na região tubulointersticial do córtex e da medula externa renal dos animais que receberam ADR. Este efeito pode ser explicado, em parte, pela maior expressão de VEGF observada do grupo ADT em relação ao grupo ADNT. Estudos indicam que o VEGF, ao se ligar ao receptor tipo 2 (VEGFR2 ou Flk-1), o qual é primariamente expresso nas células endoteliais, estimula a expressão de eNOS nas células endoteliais, pela via de sinalização PI3K/Akt, resultando na geração de NO derivado do endotélio (FELIERS et al., 2005; GENTILE; MUISE-HELMERICKS; DRAKE, 2013). O VEGFR2 ativa a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), resultando na produção de fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), que por sua vez é necessário para a fosforilação da quinase Akt. A Akt ativada fosforila a eNOS, ativando esta enzima (DAYANIR et al., 2001; FELIERS et al., 2005; SHEN; LEE; ZIONCHECH, 1999). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a eNOS aumenta a proliferação e a migração de células endoteliais (BABAEI.; STEWART, 2002; BACH; SADOUN; REED, 2005; KUPATT et al., 2007). O aumento da expressão de eNOS tem sido observado após a prática da atividade física em modelos de alterações cardiometabólicas, infarto do miocárdio e hipertensão (ADAMS et al., 2015; MEDEIROS et al., 2016; FERNANDES et al., 2012).

A diminuição das lesões tubulointersticiais no córtex renal dos ratos previamente treinados e tratados com ADR também pode estar relacionada com menor redução da expressão de VEGF e eNOS no córtex renal destes animais. As diminuições das expressões destas proteínas contribuem para o processo de fibrose tecidual em doenças progressivas. No estudo de Kang et al. (2001c), a administração de VEGF em modelo de ablação renal em ratos foi capaz de reduzir a fibrose tubulointersticial e este efeito esteve relacionado à manutenção dos capilares peritubulares. Sun et al. (2013), utilizando modelo de nefropatia induzida por ADR em camundongos resistentes a este quimioterápico, porém deficientes de eNOS, observaram fibrose intersticial severa, caracterizada pela elevação da expressão de fibronectina e colágeno tipo IV, o que tornou estes animais suscetíveis à nefrotoxicidade provocada pela ADR. Além disso, em outro estudo realizado por Savard et al. (2012), a administração de adenovírus inativado contendo gene eNOS em modelo de redução de massa renal em ratos diminuiu a deposição de colágeno no espaço tubulointersticial do córtex renal destes animais. A atividade física proporcionou benefícios em relação à redução de fibrose do miocárdio e prevenção de apoptose, após indução de infarto do miocárdio em camundongos, contudo em animais com deficiência de eNOS, estes efeitos foram abolidos, sugerindo a estreita relação entre a eNOS e o exercício físico (WAARD et al., 2010).

No presente estudo, o treinamento físico prévio não alterou a marcação de aminopeptidase P nos glomérulos dos animais que receberam ADR, sugerindo que o pré-condicionamento não modificou a densidade de capilares glomerulares neste modelo. Não foram também observadas diferenças estatísticas nas expressões de VEGF e eNOS nos glomérulos entre os grupos de animais que foram tratados com ADR.

7 CONCLUSÃO

O treinamento físico prévio à injeção de ADR reduziu as lesões renais induzidas por este quimioterápico, prevenindo a queda da TFG e elevação dos níveis plasmáticos de creatinina, diminuindo as alterações de podócitos, albuminúria, fibrose na região tubulointersticial e atenuando a perda de capilares peritubulares. Estes efeitos estiveram associados com as reduções do processo inflamatório, das lesões das células endoteliais e das alterações dos fatores relacionados ao processo de angiogênese (VEGF e eNOS) no córtex renal.

REFERÊNCIAS¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

ABBATE, M.; ZOJA, C.; REMUZZI, G. How does proteinuria cause progressive renal damage? **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, p.2974-84, 2006.

ABE, K. et al. The membrane attack complex, C5b-9, up regulates collagen gene expression in renal tubular epithelial cells. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 136, n. 1, p. 60-6, 2004.

ADAMS, V. et al. High-intensity interval training attenuates endothelial dysfunction in a Dahl salt-sensitive rat model of heart failure with preserved ejection fraction. **Journal of Applied Physiology**, v. 119, n. 6, p. 745-52, 2015.

AGRAWAL, V. et al. Reduced podocin expression in minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis is related to the level of proteinuria. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 17, n.6, p. 811-8, 2013.

AMARAL, L. S. et al. Beneficial effects of previous exercise training on renal changes in streptozotocin-induced diabetic female rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 4, p. 437-45, 2016.

ANAN, H. H. et al. Therapeutic efficacy of bone marrow derived mesenchymal stromal cells versus losartan on adriamycin-induced renal cortical injury in adult albino rats. **Cytotherapy**, v. 18, p. 970–84, 2016.

BABAEI, S.; STEWART, D. J. Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model. **Cardiovascular Research**, v. 55, p. 190-200, 2002.

BACH, M. H. M; SADOUN, E.; REED, M. J. Defects in activation of nitric oxide synthases occur during delayed angiogenesis in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 4, p. 467-73, 2005.

BACHMANN, S.; BOSSE, H. M.; MUNDEL, P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 268, p. F885-98, 1995.

BARKER, L. E.; SHAW, K. M. Statistical commentary best (but oft-forgotten) practices: checking assumptions concerning regression residuals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 3, p. 533-9, 2015.

BARNES, V. L. et al. Expression of embryonic fibronectin isoform EIIIA parallels alpha-smooth muscle actin in maturing and diseased kidney. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 787-98, 1999.

BARONI, E. A. et al. Heparin treatment reduces glomerular injury in rats with adriamycin-induced nephropathy but does not modify tubulointerstitial damage or the renal production of transforming growth factor-beta. **Nephron**, v. 84, n. 3, p. 248-57, 2000.

BARONI, E. A. et al. Sodium bicarbonate treatment reduces renal injury, renal production of transforming growth factor-beta, and urinary transforming growth factor-beta excretion in rats with doxorubicin-induced nephropathy. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 34, n. 2, p. 328-37, 1999.

BENEKE, R., HÜTLER, M.; LEITHÄUSER, R. M. Maximal lactate-steady-state independent of performance. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 6, p. 1135-9, 2000.

BERCHTOLD, N. C.; CASTELLO, N.; COTMANA, C. W. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. **Neuroscience**, v. 167, n. 3, 19, p. 588-97, 2010.

BERTANI T. et al. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. **Kidney International**, v. 30, p. 488-96, 1986b.

BERTANI, T. et al. Adriamycin-induced glomerulosclerosis in rat. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 7, n. 1, p. 12-19, 1986a.

BERTANI, T. et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. **Laboratory Investigation**, v. 46, n. 1, p. 16-23, 1982.

BOHLE, A.; MACKENSEN-HAEN, S; WEHRMANN, M. Significance of postglomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 19, p. 191-5, 1996.

BOO, Y. C. et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 5, p. 388-96, 2002.

BORER, K. T. Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women: interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. **Sports Medicine**, v. 35, n. 9, p. 779-830, 2005.

BOULANGER, C. M. Endothelium. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, p. 26-31, 2016.

BOULOUMIÉ, A.; SCHINI-KERTH, V. B.; BUSSE, R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v. 41, n. 3, p. 773-80, 1999.

BOUTE, N. et al. *NPHS2*, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. **Nature Genetics**, v. 24, p. 349-54, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BURTON, C. J. et al. Fibronectin production by human tubular cells: The effect of apical protein. **Kidney International**, v. 50, p. 760-7, 1996.

CAREY, A. V.; CAREY, R. M.; GOMEZ, R. A. Expression of alpha-smooth muscle actin in the developing kidney vasculature. **Hypertension**, v. 19, n. 2, p. 168-75, 1992.

CHADE, A. R. et al. Renal therapeutic angiogenesis using a bioengineered polymer-stabilized vascular endothelial growth factor construct. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 6, p. 1741-52, 2016.

CHEN, K. C. et al. Exercise rescued chronic kidney disease by attenuating cardiac hypertrophy through the cardiotrophin-1→LIFR/gp 130→JAK/STAT3 pathway. **European Journal of Preventive Cardiology**, 21, n. 4, p. 507-20, 2014.

CHEN, S. et al. Effect of simvastatin on the expression of nephrin, podocin, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in podocytes of diabetic rat. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 18225-34, 2015.

CHENG, S. T. Cognitive reserve and the prevention of dementia: the Role of Physical and Cognitive Activities. **Current Psychiatry Reports**, v. 18, n. 85, p. 1-12, 2016.

CIANCIOLO, R. et al. Gene expression analysis and urinary biomarker assays reveal activation of tubulointerstitial injury pathways in a rodent model of chronic proteinuria (doxorubicin nephropathy). **Nephron Experimental Nephrology**, v. 124, p. 1-10, 2013.

CINES, D. B. et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **The Journal of The American Society of Hematology Blood**, v. 91, n. 10, p. 3527-61, 1998.

COIMBRA, T. M. et al. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes, **Kidney International**, v. 57, n. 1, p. 167-182, 2000.

COIMBRA, T. M. et al. Effects of administration of cationic and native homologous albumin on kidney. **Nephron**, v. 33, n. 3, p. 208-15, 1983.

CUNHA, R. R. et al. Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, p. 351-7, 2009.

DAVIES, P. F. Flow-mediated endothelial mechano transduction. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 3, p. 519-60, 1995.

DAYANIR, V. et al. Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-Kinase and cell proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 17686-92, 2001.

DE ARAUJO, G. G. et al. Padronização de um protocolo experimental de treinamento periodizado em natação utilizando ratos Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 1, p. 51-6, 2010.

DE ARAUJO, G. G. et al. Physiological responses during linear periodized training in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 112, p. 839-52, 2012.

DEEPA, P. R.; VARALAKSHMI, P. Beneficial cardio-renal effects of a low-molecular-weight heparin-derivative on adriamycin-induced glycosaminoglycanuria and tissue lipid abnormalities. **Toxicology**, v. 211, p. 77-85, 2005.

DEFINA, L. F. et al. The association between midlife cardiorespiratory fitness and later life chronic kidney disease: The Cooper Center Longitudinal Study. **Preventive Medicine**, v. 89, p. 178-83, 2016.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313-26, 2009.

DI FRANCESCO MARINO, S. et al. The effect of physical exercise on endothelial function. **Sports Medicine**, v. 39, n. 10, p. 797-812, 2009.

DIAZ, K. M.; SHIMBO, D. Physical activity and the prevention of hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 15, n. 6, p. 659-68, 2013.

DIJKSTRA, C. D. et al. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal. **Immunology**, v. 54, n. 3, p. 589-99, 1985.

DIMEO, F. et al. Aerobic exercise reduces blood pressure in resistant hypertension. **Hypertension**, v. 60, p. 653-8, 2012.

DIMKE, H. et al. Tubulovascular cross-talk by vascular endothelial growth factor a maintains peritubular microvasculature in kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 5, p. 1027-38, 2015.

DROSTE, S. K. et al. Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level. **Neuroendocrinology**, v. 86, p. 26-37, 2007.

DUDZINSKI, D. M. et al. The regulation and pharmacology of endothelial nitric synthase. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, p. 235-76, 2006.

EARDLEY, K. S. et al. The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 69, n. 7, p. 1189-97, 2006.

EDDY, A. A. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, n. 12, p. 2495-508, 1996.

EDDY, A. A. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. **Kidney International Supplements**, v. 4, n. 1, p. 2-8, 2014.

EDDY, A. A. Proteinuria and interstitial injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, n. 2, p. 277-81, 2004.

ENDRES, M. et al. Mechanisms of stroke protection by physical activity. **Annals of Neurology**, v. 54, n. 5, p. 582-90, 2003.

EREMINA, V. et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 707-16, 2003.

EREMINA, V. et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1129-36, 2008.

ESCRIBANO, B. M. et al. Impact of light/dark cycle patterns on oxidative stress in an adriamycin-induced nephropathy model in rats. **PLOS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1-10, 2014.

FAN, Q. et al. Reduction in VEGF protein and phosphorylated nephrin associated with proteinuria in adriamycin nephropathy rats. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 111, p. e92-102, 2009.

FARREL, S. W. et al. Cardiorespiratory fitness, different measures of adiposity, and cancer mortality in men. **Obesity**, v. 15, n. 12, p. 3140-9, 2007.

FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric oxide. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 55, p. 7-20, 1996.

FELIERS, D. et al. VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells. **Kidney International**, v. 68, n. 4, p. 1648-59, 2005.

FELIX, J. V. C.; MICHELINI, L. C. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarius. **Hypertension**, v. 50, n. 4, p. 780-5, 2007.

FERNANDES, T. et al. Exercise training restores the endothelial progenitor cells number and function in hypertension: implications for angiogenesis. **Journal of Hypertension**, v. 30, n. 11, p. 2133-43, 2012.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. **Kidney International**, v. 56, p. 794-814, 1999.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 161, n. 2, p. 851-8, 1989.

FERRARA, N.; KERBEL, R. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, v. 438, p. 967-74, 2005.

FERRARESCO, R. L. P. et al. Interaction between overtraining and the interindividual variability may (not) trigger muscle oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 760-5, 2007.

FINER, G. et al. Divergent roles of Smad3 and PI3-kinase in murine adriamycin nephropathy indicate distinct mechanisms of proteinuria and fibrogenesis. **Kidney International**, v. 82, n. 5, P. 525-36, 2012.

FORD, E. S. Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults. **Epidemiology**, v. 13, n. 5, p. 561-8, 2002.

FÖRSTERMANN, U. et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6, p. 1121-31, 1994.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 1123, n. 13, p. 1708-14, 2006.

FRANCESCATO, H. D. C. et al. Role of endogenous hydrogen sulfide on renal damage induced by adriamycin injection. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 12, p. 1597-606, 2011.

FREITAS, A. S. M et al. Urinary transforming growth factor-beta (TGF-beta) excretion and renal production of TGF-beta in rats with subtotal renal ablation: effect of enalapril and nifedipine. **Nephron**, v. 78, n.3, p.302-9, 1998.

FUTRAKUL, N. et al. A defective angiogenesis in chronic kidney disease. **Renal Failure**, v. 30, n. 2, p. 215-7, 2008.

GALLANAGH, S. et al. Physical activity in the prevention and treatment of stroke. **IRSN Neurology**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

GALLI, L. G. et al. Tubular cell lesion, albuminuria, and renal albumin handling in rats treated with adriamycin. **Renal Failure**, v. 23, n. 5, p. 693-703, 2001.

GAO, K. et al. 5'-AMP-Activated protein kinase attenuates adriamycin induced oxidative podocyte injury through thioredoxin mediated suppression of the apoptosis signal-regulating kinase 1-P38 signaling pathway. **Molecular Pharmacology**, v. 85, p. 460-71, 2014.

GAO, Y. et al. Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways. **Brain Research**, v. 1585, p. 83-90, 2014

GENTILE, C.; MUISE-HELMERICKS, R. C.; DRAKE, C. J. VEGF-mediated phosphorylation of eNOS regulates angioblast and embryonic endothelial cell proliferation. **Developmental Biology**, v. 373, n. 1, p. 163-75, 2013.

GERBER, H. P. et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 46, p. 30336-43, 1998.

GERBER, H. P.; DIXIT, V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 13313-6, 1998.

GERTZ, K. et al. Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. **Circulation Research**, v. 99, p. 1132-40, 2006.

GLASSOCK, R. J. Urinary chemoattractant protein 1: a new biomarker of renal fibrosis. **American Journal of Nephrology**, v. 43, n.6, p. 451-3, 2016.

GOLIGORSKY, M. S. Pathogenesis of endothelial cell dysfunction in chronic kidney disease: a retrospective and what the future may hold. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 34, p. 76-82, 2015.

GUSTAFSSON, T. et al. Increased expression of VEGF following exercise training in patients with heart failure. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, n. 4, p. 362-6, 2001.

HAHN, H. et al. Age-related differences in adriamycin-induced nephropathy. **Pediatric Nephrology**, v. 19, p. 761-6, 2004.

HAMBRECHT, R. et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 107, n. 25, p. 3152-8, 2003.

HARAM, P. M.; KEMI, O. J.; WISLOFF, U. Adaptation of endothelium to exercise training: Insights from experimental studies. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 336-46, 2008.

HAUGEN, H. N. The determination of endogenous creatinine in plasma and urine **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 5, n. 1, p. 48-57, 1953.

HAWKINS, M. S. et al. Association between physical activity and kidney function: National Health and Nutrition Examination Survey. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 43, n. 8, p. 1457-64, 2011.

HE, W. et al. Blockade of Wnt/Catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 1, p. 90-103, 2011.

HEERINGA, P. et al. Lack of endothelial nitric oxide synthase aggravates murine accelerated anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 3, p. 879-88, 2000.

HEIN, T. W. et al. Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. **Atherosclerosis**, v. 206, n.1, p. 61-8, 2009.

HOWDEN, E. J. et al. Effects of exercise and lifestyle intervention on cardiovascular function in CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, n. 8, p. 1494-501, 2013.

ITO, D. et al. Chronic running exercise alleviates early progression of nephropathy with upregulation of nitric oxide synthases and suppression of glycation in Zucker diabetic rats. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1-21, 2015.

JEANSSON, M. et al. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 1, p. 114-22, 2009.

JENNINGS, G. et al. The effects of changes in physical activity on major cardiovascular risk factors, hemodynamics, sympathetic function, and glucose utilization in man: a controlled study of four levels of activity. **Circulation**, v. 73, n. 1, p. 30-40, 1986.

KADOGLU, N. P. et al. The anti-inflammatory effects of exercise training promote atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E knockout mice with diabetic atherosclerosis. **European Journal of Histochemistry**, v. 57, n. 1, p. 16-23, 2013.

KAGIMOTO, H. et al. Inhibition of eNOS phosphorylation mediates endothelial dysfunction in renal failure: new effect of asymmetric dimethylarginine. **Kidney International**, v. 81, n. 8, p. 762-8, 2012.

KAIRAITIS, L. K. et al. HIF-1 α expression follows microvascular loss in advanced murine adriamycin nephrosis. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 288, n. 1, p. F198-206, 2005.

KALYANARAMAN, B., SEALY, R. C.; SINHA, B. K. An electron spin resonance study of the reduction of peroxides by anthracycline semiquinones. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 799, n. 3, p. 270-5, 1984.

KANELIS, J. et al. Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 278, n. 6, p. F905-15, 2000.

KANESAKI, Y. et al. Vascular endothelial growth factor gene expression is correlated with glomerular neovascularization in human diabetic nephropathy. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 45, n. 2, p. 288-94, 2005.

KANG, D. H. et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 7, p. 1434-47, 2001a.

KANG, D. H. et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 7, p. 1448-57, 2001c.

KANG, D. H. et al. Post-cyclosporine-mediated hypertension and nephropathy: amelioration by vascular endothelial growth factor. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 280, p. F727-36, 2001b.

KANG, D. H. et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 3, p. 806-16, 2002.

KELLEY, G. A.; KELLEY, K. S. Aerobic exercise and lipids and lipoproteins in men: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The Journal of Men's Health & Gender**, v. 3, n. 1, p. 61-70, 2006.

KIM, N. H. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in response to high glucose in rat mesangial cells. **Journal of Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 617-24, 2000.

KITAGAWA, K. et al. Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. **The American Journal of Pathology**, v. 165, n. 1, p. 237-46, 2004.

KITAMOTO, Y. et al. Glomerular endothelial cells are maintained by vascular endothelial growth factor in the adult kidney. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 43-54, 2001.

KLIEM, V. et al. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. **Kidney International**, v. 49, n. 3, p. 666-78, 1996.

KNOWLER, W. C. et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 6, p. 393-403, 2002.

KRIZ et al. Tracer studies in the rat demonstrate misdirected filtration and peritubular filtrate spreading with segmental glomerulosclerosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 3, p. 496-506, 2001.

KRIZ, W. The pathogenesis of "classic" focal segmental glomerulosclerosis-lessons from rat models. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, suppl. 6, p.39-44, 2003.

KUIPERS, H. et al. Variability of aerobic performance in the laboratory and its physiologic correlates. **International Journal of Sports Medicine**, v. 6, p. 197-201, 1985.

KUPATT, C. et al. Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 14, 2007.

KUSANO, T. et al. Endothelial cell injury in acute and chronic glomerular lesions in patients with IgA nephropathy. **Human Pathology**, v. 49, p. 135-44, 2016.

LAKKA, T. A.; LAAKSONEN, D. E. Physical activity in prevention and treatment of the metabolic syndrome. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 76-88, 2007.

LAURELL, C. B. Electroimmunoassay, **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 29, n. 124, p. 21-37, 1972.

LEE, J. et al. Altered nitric oxide system in cardiovascular and renal diseases. **Chonnam Medical Journal**, v. 52, p.81-90, 2016.

LEE, J.; PARK, S.; KIM, W. K. Exercise preconditioning reduces acute ischemic renal injury in Hsp70.1 knockout mouse. **Histology and Histopathology**, v. 28, n. 9, p 1223-33, 2013.

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

LESNIEWSKI, L. A. et al. Aerobic exercise reverses arterial inflammation with aging in mice. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 3, p. 1025-32, 2011.

LEWIS, M. I. et al. Effect of endurance and/or strength training on muscle fiber size, oxidative capacity, and capillarity in hemodialysis patients. **Journal of Applied Physiology**, v. 119, n. 8, p. 865-71, 2015.

LI, H.; HORKE, S; FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 4, n. 6, p. 313-9, 2013.

LINKE, A.; ERBS, S.; HAMBRECH, R. Effects of exercise training upon endothelial function in patients with cardiovascular disease. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 424-32, 2008.

LIU, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, v.7, p. 684-96, 2011.

LUI, S. L. et al. Rapamycin attenuates the severity of murine adriamycin nephropathy. **American Journal of Nephrology**, v. 29, p. 342-52, 2009.

LUIZ, R. S. et al. Exercise attenuates renal dysfunction with preservation of myocardial function in chronic kidney disease. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2013.

MACHADO, F. M. et al. Chronic VEGF blockade worsens glomerular injury in the remnant kidney model. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1-10, 2012.

MANCHADO, F. B. et al. Maximal lactate steady state in running rats. **Journal of Exercise Physiology**, v. 8, n. 4, p. 29-35, 2005.

McQUILLAN, L. P. et al. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. **The American journal of physiology**, v. 267, p. H1921-7, 1994.

MEDEIROS, R. F. et al. Aerobic training prevents oxidative profile and improves nitric oxide and vascular reactivity in rats with cardiometabolic alteration. **Journal of Applied Physiology**, v. 121, n. 1, p. 289-8, 2016.

MELZER, K. et al. Alterations in energy balance from an exercise intervention with ad libitum food intake. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1-10, 2016.

MENG, X.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; LAN, H. Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, p. 325-32, 2016.

MIMNAUGH, E. G. Potentiation by reduced glutathione of adriamycin-stimulated lipid peroxidation in kidney microsomes. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n.23, p. 4337-9, 1986.

MIYAGI, M. Y. S. et al. Long-term aerobic exercise protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by modulating the expression of IL-6 and HO-1. **PLOS ONE**, 2014; v. 9, n. 10, 2014.

MOLITORIS, B. A.; SUTTON, T. A. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. **Kidney International**, v. 66, n. 2, p. 496-9, 2004.

MORAES, M. S. et al. Endothelium-derived nitric oxide (NO) activates the NO-epidermal growth factor receptor-mediated signaling pathway in bradykinin-stimulated angiogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 558, p. 14-27, 2014.

MORIIA, T et al. Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 17, n. 1, p. 11-5, 2003.

MOUNT, P. F.; POWER, D. A. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. **Acta Physiology**, v. 187, p. 433-46, 2006.

MOURÃO, F. A. G., et al. Neuroprotective effect of exercise in rat hippocampal slices submitted to *in vitro* ischemia is promoted by decrease of glutamate release and pro-apoptotic markers. **Journal of Neurochemistry**, v. 131, p. 65-73, 2014.

MOYNA, N. M.; THOMPSON, P. D. The effect of physical activity on endothelial function in man. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 180, n. 2, p. 113-23, 2004.

NAKAYAMA, T. et al. Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, p. 539-50, 2007.

NAKAYAMA, T. et al. Endothelial injury due to eNOS deficiency accelerates the progression of chronic renal disease in the mouse. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 296, n. 2, p. F317–F327, 2009.

NAKAYAMA, T. et al. Uncoupling of VEGF with endothelial NO as a potential mechanism for abnormal angiogenesis in the diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

NICULESCU-DUVAZ, I et al. The TGF β 1-induced fibronectin in human renal proximal tubular epithelial cells is p38 MAP Kinase dependent and Smad independent. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 105, p. 108-16, 2007.

NOH, J. W.; WIGGINGS, R.; PHAN, S. H. Urine transforming growth factor-beta activity is related to the degree of scarring in crescentic nephritis in the rabbit. **Nephron**, v. 63, n. 1, p. 73-8, 1993.

NYLEN, E. S. et al. Enhanced fitness and renal function in Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 32, n. 10, p. 1342-5, 2015.

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

ONOZAKI, A. et al. Rapid change of glucose concentration promotes mesangial cell proliferation via VEGF: inhibitory effects of thiazolidinedione. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 317, n. 1, p.24-9, 2004.

PASSOS, C. S. et al. Cardiovascular and renal effects of birdseed associated with aerobic exercise in rats. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 48, n. 10, p. 1925-34, 2016.

PECHTER, Ü.; RAAG, M.; ROSENBERG, M. Regular aquatic exercise for chronic kidney disease patients: a 10-year follow-up study. **International Journal of Rehabilitation Research**, v. 37, n. 3, p. 251-5, 2014.

PENG, C. et al. Ferulic acid is nephrodamaging while gallic acid is renal protective in long term treatment of chronic kidney disease. **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 3, p. 405-14, 2012.

PERRY, H. M.; OKUSA, M. D. Endothelial dysfunction in renal interstitial fibrosis. **Nephron**, v. 134, n. 3, p. 167-71, 2016.

POIRIER, P.; DESPRÉS, J. P. Exercise in weight management of obesity. **Cardiology Clinics**, v. 19, n. 3, p. 459-70, 2001.

POZZI, A. PI3-kinase and TGF- β in glomerular nephropathy: which comes first? **Kidney International**, v. 82, v. 5, p. 507-9, 2012.

RADENKOVIC, M.; STOJANOVIC, M.; PROSTRAN, M. Endothelial dysfunction in renal failure: Current update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 19, p. 2047-54, 2016.

RAJENDRAN, P. et al. The vascular endothelium and human diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1057-69, 2013.

RASHID, S. et al. Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 21, n. 5, p. 337-45, 2013.

RESNICK, N. et al. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 81, n. 3, p. 177-99, 2003.

ROBINSON-COHEN, C. et al. Physical activity and change in estimated GFR among persons with CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 2, p. 399-406, 2014.

ROSELLI, S. et al. Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient Mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 2 p. 550-60, 2004.

SAVARD, S. et al. eNOS gene delivery prevents hypertension and reduces renal failure and injury in rats with reduced renal mass. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, p.2182-90, 2012.

SCARIOT, P. M. et al. Continuous aerobic training in individualized intensity avoids spontaneous physical activity decline and improves MCT1 expression in oxidative muscle of swimming rats. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 1-10, 2016.

SCHMIDT, R. J. et al. Nitric oxide production is low in end-stage renal disease patients on peritoneal dialysis. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 276, n. 5, 1999.

SCHWARZ, K. et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 11, p. 1621-9, 2001.

SCOTT, R. P.; QUAGGIN, S. E. The cell biology of renal filtration. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 199-210, 2015.

SEBE, A. et al. Transforming growth factor- β -induced alpha-smooth muscle cell actin expression in renal proximal tubular cells is regulated by p38 β mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated protein kinase1,2 and the Smad signalling during epithelial-myofibroblast transdifferentiation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 5, p. 1537-45, 2008.

SENGER, D. R. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 983-5, 1983.

SHANKLAND, S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. **Kidney International**, v. 69, n. 12, p. 2131-47, 2006.

SHEN, B. Q.; LEE, D. Y; ZIONCHECH, T. F. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 46, p. 33057-63, 1999.

SHIMIZU, H. et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n.6, p. 1496-505, 2003.

SHU, Y. et al. Phenotypic changes and cell cycle activation in early tubulointerstitial injury of rat adriamycin nephrosis. **Pathology International**, v. 52, p. 214-23, 2002.

SHUI, H. et al. Fibronectin in blood invokes the development of focal segmental glomerulosclerosis in mouse model. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, p. 1794-802, 2006.

SILVA Jr, J. A. S. et al. Exercise training can prevent cardiac hypertrophy induced by sympathetic hyperactivity with modulation of kallikrein-kinin pathway and angiogenesis. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1-9, 2014.

SILVA, K. A. S. et al. Previous exercise training has a beneficial effect on renal and cardiovascular function in a model of diabetes. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1-10, 2012.

STEFANICK, M. L. et al. Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 1, p. 12-20, 1998.

SUN, D. et al. Effects of nitric oxide on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. **Life Sciences**, v. 90 n. 23-24, p. 900-9, 2012.

SUN, Y. B. Y. et al. Glomerular endothelial cell injury and damage precedes that of podocytes in adriamycin-induced nephropathy. **PLOS ONE**, v.8, n. 1, p. 1-12, 2013.

TANG, S. et al. Transferrin up-regulates chemokine synthesis by human proximal tubular epithelial cells: Implication on mechanism of tubuloglomerular communication in glomerulopathic proteinuria. **Kidney International**, v. 61, n. 5, p. 1655-65, 2002.

TENTORI, F. et al. Physical exercise among participants in the dialysis outcomes and practice patterns study (DOPPS): correlates and associated outcomes. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 9, p. 3050-63, 2010.

THOMPSON, P. D. et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. **Circulation**, p. 3109-16, v. 107, n. 24, 2003.

TINKEN, T. M. et al. Shear stress mediates endothelial adaptations to exercise training in humans. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 312-8, 2010.

TJONNA, A. E. et al. Time course of endothelial adaptation after acute and chronic exercise in patients with metabolic syndrome. **Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 25, n. 9, p. 2552-8, 2011.

TUFRO, A. et al. Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 10, p. 2125-34, 1999.

ULU, N. et al. Vascular dysfunction in adriamycin nephrosis: different effects of adriamycin exposure and nephrosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, p. 1854-60, 2008.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial control of vasomotor function from health to coronary disease. **Circulation Journal**, v. 67, p. 572-5, 2003.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiologica**, v. 196, p. 193-222, 2009.

VRIESE, A. S. D., et al. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, p. 993-1000, 2001.

WAARD, M. C. et al. Beneficial effects of exercise training after myocardial infarction require full eNOS expression. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 6, p. 1041-9, 2010.

WADA, T. et al. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. **Kidney International**, v. 49, n. 3, p. 761-7, 1996.

WANG, J.; WOLIN, M. S.; HINTZE, T. H. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. **Circulation Research**, v. 73, n. 5, p. 829-38, 1993.

WANG, X. et al. Tubulointerstitial fibrosis of living donor kidneys associates with urinary monocyte chemoattractant protein 1. **American Journal of Nephrology**, v. 43, n.6, p. 455-9, 2016.

WANG, Y. et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, p. 1537-45, 1997.

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

WANG, Z; LIU, J; SUN, W. Effects of asiaticoside on levels of podocyte cytoskeletal proteins and renal slit diaphragm proteins in adriamycin-induced rat nephropathy. **Life Sciences**, v. 93, n. 8, p. 352-8, 2013.

WEINER, C. P. et al. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 11, p. 5212-16, 1994.

WHELTON, S. P. et al. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. **Annals of Internal Medicine**, v. 136, n. 7, p. 493-503, 2002.

WILLIAMS, J. L. et al. VEGF trap abolishes shear stress- and overload-dependent angiogenesis in skeletal muscle. **Microcirculation**, v. 13, n. 6, p. 499-509, 2006.

WING, R. R.; HILL, J. O. Successful weight loss maintenance. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 323-41, 2001.

WOHLFARTH, V. et al. Protein uptake disturbs collagen homeostasis in proximal tubule-derived cells. **Kidney International Supplements**, v. 84, p. 103-9, 2003.

WU, H. et al. DNA vaccination with naked DNA encoding MCP-1 and RANTES protects against renal injury in adriamycin Nephropathy. **Kidney International**, v. 67, p. 2178-86, 2005.

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 199-210, 2008.

XU, Ying et al. The contribution of lifestyle factors to depressive symptoms: A cross-sectional study in Chinese college students. **Psychiatry Research**, v. 245, p. 243-249, 2016.

XU, Yixiao et al. Matrine ameliorates adriamycin-induced nephropathy in rats by enhancing renal function and modulating Th17/Treg balance. **European Journal of Pharmacology**, v. 791, p. 491-501, 2016.

YAN, G. et al. Tumor necrosis factor- α down regulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1- α 1. **Circulation Research**, p. 591-7, v. 103, n. 6, 2008.

YANG, L.; SHIRONG, Z.; EPSTEIN, P. N. Metallothionein over-expression in podocytes reduces adriamycin nephrotoxicity. **Free Radical Research**, v. 43, n. 2, p. 174-82, 2009.

YESAIR, D. W. et al. Comparative pharmacokinetics of daunomycin and adriamycin in several animal species. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 32, p. 1177-83, 1972.

ZHU, C. et al. Dysfunction of the PGC-1 α -mitochondria axis confers adriamycin-induced podocyte injury. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 306, n.12, p. F1410-17, 2014.

ZOJA, C. et al. Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF- κ B activation. **Kidney International**, v. 53, p. 1608-15, 1998.

ZOJA, C. et al. Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 26, n. 6, p. 934-41, 1995.

ZOJA, C.; ABBATE, M.; REMUZZI, G. Progression of renal injury toward interstitial inflammation and glomerular sclerosis is dependent on abnormal protein filtration. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, p. 706-12, 2015.

ZOJA, C.; BENIGNI, A.; REMUZZI, G. Cellular responses to protein overload: key event in renal disease progression. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 13, p. 31-7, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Artigo publicado na revista Life Sciences

Life Sciences 169 (2017) 43–51

Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Effects of previous physical training on adriamycin nephropathy and its relationship with endothelial lesions and angiogenesis in the renal cortex

Camila M. Faleiros^a, Heloísa D.C. Francescato^a, Marcelo Papoti^b, Lucas Chaves^a, Cleonice G.A. Silva^a, Roberto S. Costa^c, Terezila M. Coimbra^{a,*}^a Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil^b School of Physical Education and Sports of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil^c Department of Pathology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 July 2016

Received in revised form 10 November 2016

Accepted 19 November 2016

Available online 21 November 2016

Keywords:

Adriamycin toxicity

Angiogenesis

Endothelial lesions

Previous physical training

Renal disease progression

ABSTRACT

Aims: Adriamycin (ADR)-induced nephropathy is one of the most experimental models used in progressive kidney disease. A single dose of this drug induces a progressive and irreversible proteinuria that progresses to focal segmental glomerulosclerosis and tubulointerstitial lesions. Regular physical activity has been considered as a therapeutic intervention in several diseases. This study evaluated the influence of previous physical training in renal damage induced by ADR and the role of endothelial lesions and angiogenesis in this process.

Main methods: Male Wistar rats were subjected or not to treadmill running for 4 weeks and then injected with ADR (2.5 mg/kg, i.v.) or saline. Twenty-four-hour urine samples were collected for albuminuria measurement, and blood samples were collected to measure plasma creatinine 60 days after the injections. The kidneys were removed for histological, immunohistochemical, Western blot and ELISA studies.

Key findings: ADR-treated rats presented increases in plasma creatinine levels, albuminuria, podocyte damage, and enlargement of the tubular interstitial relative area, as well as higher macrophage numbers in the renal cortex, interleukin (IL)-1 β levels in renal tissue and urinary monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, which were associated with reduction in vascular endothelial growth factor (VEGF), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expressions and peritubular capillary (PTC) density in renal cortex. These alterations were less intense in the animals subjected to previous exercise training.

Significance: Physical training prior to ADR injection reduced the renal damage induced by this drug. This effect was related to angiogenesis and reduction in the endothelial lesions and inflammatory process in the renal cortex of these animals.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Several kidney diseases progress to a final stage of fibrosis in which highly specialized structures are replaced by fibroblasts and collagens, occurring alongside progressive loss of kidney function [1]. Adriamycin (ADR)-induced renal damage is an experimental model of progressive kidney disease [2]. ADR is one of the most used drugs for the treatment of neoplastic diseases. However, its use is limited due to its toxic effect in several organs and tissues. In rats, a single dose of ADR induces progressive and irreversible proteinuria, leading to tubulointerstitial injury, characterized by severe inflammatory cell infiltration, glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, tubular lumen dilation, and atrophy of tubular cells [3]. The inflammatory process in the renal cortical tubulointerstitium results from tubular cell exposition to filtered proteins by the glomerulus. The reabsorption of these molecules by tubular cells can lead to the

recruitment of macrophages and lymphocytes to the tubulointerstitial area [4]. Macrophages cause local damage by the generation of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. Macrophages also promote the transdifferentiation of tubular epithelial cells into fibroblasts, contributing to renal interstitial fibrosis [5–7].

The increase in the permeability of the glomerular capillaries to albumin through the walls is related to podocyte lesions. Recent studies have shown that endothelial lesions precede the podocyte damage, playing an important role in the pathogenesis of progressive renal disease [8–11]. One of the possible mechanisms of endothelial injury in renal disease is alteration in the local balance of angiogenic and endothelial survival factors [12]. VEGF has an important role in angiogenesis, by increasing capillary density and in the maintenance of vascular integrity of the kidney [13,14]. Loss of VEGF expression was observed in animal models of renal diseases, including unilateral ureteral obstruction [15], thrombotic microangiopathy [16], renal lesions induced by ADR [17] and 5/6 nephrectomy [18]. At physiological conditions, podocytes secrete VEGF and maintain the glomerular endothelial cells in a healthy

* Corresponding author.

E-mail address: trncoimbra@fmrp.usp.br (T.M. Coimbra).

state, and urine without serum protein. VEGF signals stimulate eNOS and increase the production of NO by the endothelial cells [19,20].

Regular physical activity has benefits in several diseases. Physical activity improves endothelial function in patients with cardiovascular diseases and metabolic syndrome [21–23], improves cardiac and renal function in patients with chronic kidney disease, and its practice may reduce or delay the progression of renal disease [24–26]. In a prospective observational cohort study, higher fitness was associated with a lower risk of chronic kidney disease decades later, even in at-risk populations, such as diabetics [27].

In healthy individuals, physical activity can also lead to an increase in circulating progenitor cells that is related to the rise of VEGF [13,28–30]. Exercise training upregulates nitric synthase expression in the kidneys of rats with diabetic nephropathy and hypertension, and in kidneys and hearts of rats with chronic heart failure, ameliorating renal damage, contributing to the antihypertensive effect and improving cardiac and renal function, respectively [31–33].

In this study, we evaluated the influence of physical preconditioning on the renal structure and function in rats treated with ADR and its relationship with angiogenesis, endothelial lesions, inflammation, and fibrosis.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental protocols

Male Wistar rats (70 to 80 g, $n = 27$) were provided by the Animal House of the Campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo (Ribeirão Preto, Brazil), and housed in polycarbonate cages at standard room temperature (22 °C) under a 12-h light/dark cycle with free access to standard rat chow and water. We started our study with 70 to 80 g Wistar rats because the animals gain weight during the training period, and at the end of training, the animals have reached the ideal weights for the experimental model.

The rats were initially selected according to their ability to run on a treadmill electron paramagnetic resonance EPR model (Gesam, São Paulo, Brazil) (0% inclination; daily sessions, with progressive duration (5 to 20 min) and velocity (5 up to 20 m/min), over 5 days). Only the animals that showed a positive response to the race stimulus at least three times were selected for this study. After this selection, the rats were subjected to maximum intensity testing (V_{max}). This test consisted of graded exercise on a treadmill, with increments of 3 m/min every 3 min, starting at 6 m/min up to the maximum intensity attained for each rat [34,35]. This was used to assign rats with the same performance to the trained group and to establish the initial velocity (80% of V_{max}) for determining the Maximal Lactate Steady State (MLSS), which is considered as the gold standard test in aerobic capacity determination [36–38]. The animals were then submitted to continuous running for 30 min, with a rest interval of 48 h. The animal's tail distal extremity was sectioned with a little prick and 25 μ L of blood was collected using heparinized capillary tubes, at rest, after 10, 20, and 30 min of exercise. Samples were transferred to 1.5-mL microcentrifuge tubes containing 50 μ L of sodium fluoride (1%). The lactatemia was measured by an electrochemical method using a blood lactate analyzer (YSI 2300 STAT PLUS, Yellow Spring, USA). The MLSS was assumed to be the highest exercise intensity at which the blood lactate increase did not exceed 1 mM/L from the 10th to the 30th min of exercise. The intensity at MLSS was used for the training prescription [38]. The rats were then divided into two groups. One group of these animals was subjected to exercise training (PhT, $n = 14$), and another group was not subjected to training (sedentary, SED, $n = 13$).

The physical training program lasted for 4 weeks (5 days/week), and the training sessions alternated in relation to volume and intensity throughout the week, simulating models of training used by endurance athletes. Thus, the intensity and duration varied according to two levels of aerobic training/resistance: easy = Endurance 1 (END-1) and

moderate = Endurance 2 (END-2). The END-1 level corresponded to continuous exercise lasting for 60 min using 50% of the MLSS intensity, and the END-2 level to continuous running lasting 30 min using 100% of the MLSS intensity (Table 1). This training model was adapted from Araújo et al. [39].

Forty-eight hours after the last training program, all the rats were anesthetized with isoflurane (BioChimico, Rio de Janeiro, Brazil) and injected with a single i.v. injection of ADR (2.5 mg/kg) (Libbs, Barra Funda, Brazil) or saline, through the dorsal penis vein. The sedentary (SED) and trained (PhT) groups were subdivided into four groups: (i) sedentary + saline (SED + SAL, $n = 6$), (ii) physical training + saline (PhT + SAL, $n = 6$), (iii) sedentary + adriamycin (SED + ADR, $n = 7$), and (iv) physical training + adriamycin (PhT + ADR, $n = 8$).

The 24-h urine samples were collected on days 7, 30 and 60 after saline or ADR injections for albuminuria and urinary volume measurement. On day 60 after the injections, the rats were anesthetized using sodium thiopental (40 mg/kg, i.p.). The aortic artery was cannulated, and blood samples were collected to measure plasma creatinine. The kidneys were perfused with phosphate-buffered solution (PBS; 0.15 M NaCl and 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.4) and then perfused with 4% paraformaldehyde, removed, sectioned transversely, fixed in 4% paraformaldehyde for 2 h and postfixed in Bouin's solution for 4 h. After fixation, the kidneys were rinsed in 70% ethanol and processed for paraffin embedding for histological and immunohistochemical studies.

All experimental procedures were conducted in accordance with the principles and procedures outlined in the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Animal Experimentation Committee of the University of São Paulo at Ribeirão Preto School of Medicine (protocol no. 001/2013).

2.2. Renal function studies

On post-injection days 6, 29, and 59, the rats were placed in metabolic cages and 24-h urine samples were collected to measure albumin by electroimmunoassay using an anti-rat albumin antibody [40]. The data are expressed as mg of albumin per 24 h. Plasma creatinine was measured using a colorimetric method [41].

2.3. Light microscopy and morphometric studies

Histological sections (3- μ m-thick) were stained using Masson's trichrome and examined under light microscopy. The incidence of glomerular lesions was evaluated by scores in 50 glomerulus of each kidney. The scores reflected changes in the extent of the lesion (0 = 0–5%, 1 = 5–25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, and 4 $\geq$ 75%). The tubulointerstitial lesions of the renal cortex were evaluated by measuring the fractional relative interstitial area in the renal cortex that was determined by morphometry using a light camera connected to an analyzer. Twenty grid fields (measuring 0.1 mm²) were evaluated in the renal cortex of each kidney. Interstitial areas were first manually encircled on a video screen and then determined by computerized morphometry (Axion version 4.8.3, Zeiss, Germany), and the mean values per kidney were calculated.

Table 1
Exercise training program during four weeks, according levels of endurance.

Week	Days				
	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
1	END1	END2	END1	END2	END1
2	END2	END1	END2	END1	END2
3	END2	END1	END2	END1	END2
4	END2	END1	END2	END1	END2

END-1, endurance 1; END-2, endurance 2.

2.4. Antibodies

The macrophage infiltration in renal tissue was evaluated using a monoclonal anti-rat ED1 antibody (Serotec, Oxford, UK) that only reacts with the cytoplasmic antigen present in macrophages and monocytes [42]. Podocyte lesions were evaluated using a monoclonal antibody against desmin (Dako, Glostrup, Denmark) and a polyclonal antibody against podocin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA). Extracellular matrix accumulation in glomeruli and in tubulointerstitium from the renal cortex was analyzed using a polyclonal antibody against fibronectin (Chemicon International, Temecula, USA). Angiogenesis and endothelial lesions in renal cortical tissue were evaluated using a mouse monoclonal anti-rat VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) and aminopeptidase P (JG12, a marker for endothelial cells) (eBioscience, San Diego, USA) antibodies, respectively. The nitric oxide (NO) production in the renal tissue was evaluated by immunohistochemistry using a mouse monoclonal antibody against eNOS (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) and by Western blot using a rabbit polyclonal anti-eNOS (Cell Signaling Technology, Danvers, USA).

2.5. Immunohistochemical study

Kidney sections were submitted for immunohistochemical study. The sections were incubated at 4 °C overnight with 1/40 anti-rat VEGF monoclonal antibody and 1/500 anti-rat fibronectin polyclonal antibody or for 1 h with 1/1000 anti-rat ED1 monoclonal antibody, 1/1000 anti-rat JG12, 1/200 anti-mouse eNOS, and 1/200 anti-rat desmin monoclonal antibodies. The reaction product was detected using an avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories, Burlingame, USA). The color reaction was developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma Chemical Company, St Louis, USA) and nickel chloride in the presence of H₂O₂. The sections were then counterstained using Methyl green, dehydrated, and mounted. For the evaluation of the immunoperoxidase staining for desmin, fibronectin, and JG12 in the glomerulus, and fibronectin and VEGF in the tubulointerstitial area, we analyzed 50 glomeruli and 30-grid fields of the renal cortex measuring 0.1 mm² each that were semi-quantitatively graded, and the mean score per biopsy was calculated. Each score reflected changes in the extent of staining and depended on the percentage of the grid field showing positive staining; 0 = absent staining or <5% of stained area; 1 = 5–25%; 2 = 25–50%; 3 = 50–75% and 4 ≥ 75%. Immunoperoxidase staining for ED1 was determined by counting the positive cells (infiltrating macrophages) in the renal cortical tubulointerstitium, peritubular capillaries (PTCs) positively stained for JG12 in the renal cortex were evaluated by the examination of 30-grid fields, measuring 0.1 mm² each, and the mean counts per kidney were calculated. The percentage staining for eNOS in 20 fields of the cortical tubulointerstitium was calculated using NIH ImageJ software (<http://www.nih.gov>), and the mean values per biopsy were calculated. All the fields were analyzed under 400× magnification.

2.6. Western blot studies

The tissue from renal cortex and outer medulla was homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, pH 10, 1 mM sodium pyrophosphate, 25 mM sodium fluoride, 0.001 M EDTA, pH 8) at 4 °C. Proteins (30 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes, incubated for 24 h in 30 mL of blocking buffer (PBS, 5% skim milk), washed in buffer (PBS, 0.1% Tween 20, pH 7.6) and incubated with rabbit anti-podocin (1/500), mouse anti-VEGF (1/250) and rabbit anti-eNOS (1/500) antibodies, overnight at 4 °C. To adjust the equivalence of protein loading and/or transfer, the membranes were also incubated with anti-α₁-tubulin monoclonal antibody (1/4000; Sigma

Chemical Co, St. Louis, USA) overnight at 4 °C. Blots were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1/5000; Dako, Glostrup, Denmark) or anti-mouse IgG (1/10,000; Dako, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature. Membranes were then washed and membrane-bound antibodies were detected using the Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Chemical, Rockford, USA). The intensity of the identified lanes was quantified by densitometry using ImageJ NIH image software (<http://www.nih.gov>) and was reported in arbitrary units [43]. Protein estimations were performed using the Bradford [44] method.

2.7. IL-1β and MCP-1 measurement

MCP-1 content was quantified in urine samples collected by the urinary bladder, treated with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) and stored at –70 °C until analysis. The levels of IL-1β were measured in renal tissue. The MCP-1 and IL-1β were determined using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kits according to the manufacturer's guidelines (Pierce, Rockford, USA and R&D Systems Inc., Minneapolis, USA, respectively). The values of IL-1β were expressed in pg/mg of protein and those of MCP-1 in pg/mg of creatinine.

2.8. Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) with the Newman-Keuls multiple comparison test was used for the variables with normally distributed residuals or those that showed a normal distribution after log_e transformation. The normality of the residuals and the homoscedasticity of variances were investigated through the graphics of normality and the graphic of dispersion between residues versus the observed values [45]. For data on residuals that were not normally distributed, the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test was used. Statistical analyses were performed using the STATISTICA program version 10 (StatSoft, Tulsa, USA). Graphics were built using GraphPad Prism version 6.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, USA). The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Renal function

It was observed a significant and progressive increase of urinary albumin excretion in both groups of animals injected with ADR on days 7, 30, and 60 compared with the respective controls (SED + SAL and PhT + SAL) ($p < 0.05$). However, these increases were less intense in rats from the PhT + ADR group compared with those in the SED + ADR group on days 7 and 30 after ADR injection ($p < 0.05$) (Fig. 1). An increase in creatinine plasma levels was also observed in the SED + ADR [1.26 mg/dL (1.12; 1.68)] group compared with its control (SED + SAL) [0.50 mg/dL (0.49; 0.53)] ($p < 0.05$). This increase was prevented in the PhT + ADR [0.76 mg/dL (0.45; 1.13)] group, with no difference compared with PhT + SAL [0.52 mg/dL (0.48; 0.56)]. The rats from both groups treated with ADR did not present any differences in urinary volume compared with their control groups (data not shown).

3.2. Light microscopy studies

We observed in the histological studies the presence of enlargement of the mesangial glomerular area and the interstitial relative area from the renal cortex with the presence of inflammatory infiltrate and fibrosis in ADR-treated rats. The results of morphometry showed that the increase in the interstitial relative area was presented in both ADR-treated groups; however, it was less intense in the PhT + ADR rats ($p < 0.05$) (Fig. 2).

Fig. 1. Urinary albumin excretion (Ualb) in control and experimental groups, at 7 (A), 30 (B), or 60 (C) days after injection of saline or ADR. Data are expressed as median and interquartile ranges (25–75%). ** $p < 0.01$ compared with SED + SAL; § $p < 0.01$ and § $p < 0.05$ compared with PhT + SAL; * $p < 0.05$ compared with SED + ADR. SED + SAL = sedentary + saline ($n = 6$); PhT + SAL = physical training + saline ($n = 6$); SED + ADR = sedentary + adriamycin ($n = 7$); PhT + ADR = physical training + adriamycin ($n = 8$).

3.3. Immunohistochemical and Western blot studies

The immunohistochemical studies showed increased numbers of ED1-positive cells in the tubulointerstitial area of the renal cortex from the groups treated with ADR compared with their controls; however, this increase was less intense in the PhT + ADR group ($p < 0.05$) (Fig. 3). Desmin expression at the glomerular edge was increased in both ADR-treated groups, with less intensity in the PhT + ADR group ($p < 0.05$) (Fig. 4A–E). Desmin expression at the glomerular edge is considered as a marker of podocyte damage. The normal expression of desmin in most rat strains is confined to mesangial cells, and podocytes

only express it after injury [46]. Western blot analysis showed a significantly decrease in podocin expression in ADR-treated groups compared to their controls, which was attenuated in PhT + ADR group ($p < 0.05$) (Fig. 4F and G). Increased fibronectin expression in the glomerulus was observed only in the SED + ADR group and in the tubulointerstitial area from the renal cortex in both groups of ADR-treated animals, with less intensity in the PhT + ADR group (Fig. 5) ($p < 0.05$). A decrease of VEGF and eNOS expressions was detected in the tubulointerstitial area in the renal cortex of all the ADR-treated groups, which was less intense in PhT + ADR group. This decrease was confirmed by Western blot experiments (Figs. 6 and 7). PTC density in the renal cortex, determined by

Fig. 2. Masson's trichrome-stained histological sections from the renal cortex of SED + SAL (A), PhT + SAL (B), SED + ADR (C), and PhT + ADR (D) groups. Note that the interstitial lesions in (C) are more intense than in (D). Magnification $\times 400$. Bars indicate $20 \mu\text{m}$. Score for glomerular lesion (E) and fractional interstitial area (F) 60 days after saline or ADR injections. Data are expressed as median and interquartile ranges (25–75%). ** $p < 0.01$ compared with SED + SAL; § $p < 0.01$ and § $p < 0.05$ compared with PhT + SAL; * $p < 0.05$ compared with SED + ADR. SED + SAL = sedentary + saline ($n = 6$); PhT + SAL = physical training + saline ($n = 6$); SED + ADR = sedentary + adriamycin ($n = 7$); PhT + ADR = physical training + adriamycin ($n = 8$).

Fig. 3. Immunolocalization of ED1⁺ cells (macrophages/monocytes) in the renal cortex of rats from SED + SAL (A), PhT + SAL (B), SED + ADR (C), and PhT + ADR (D) groups. Note that the numbers of ED1⁺ in the renal cortex are higher in (C) than in (D). Magnification $\times 400$. Bar indicates 20 μ m. (E) Number of ED1⁺ cells in the tubulointerstitial area from the renal cortex of control and experimental groups, 60 days after saline or ADR injections. Data are expressed as median and interquartile ranges (25–75%). ** $p < 0.01$ compared with SED + SAL; # $p < 0.05$ compared with PhT + SAL; * $p < 0.05$ compared with SED + ADR. SED + SAL = sedentary + saline (n = 6); PhT + SAL = physical training + saline (n = 6); SED + ADR = sedentary + adriamycin (n = 7); PhT + ADR = physical training + adriamycin (n = 8).

quantification of the endothelium-specific JG12 marker, was decreased in ADR-groups, but this reduction was less prominent in the PhT + ADR group ($p < 0.05$) (Fig. 8).

3.4. IL-1 β and MCP-1 measurement

The results of ELISA assay showed higher contents of IL-1 β in renal tissue and increased urinary excretion of MCP-1 in ADR-treated groups compared to their controls. These alterations were attenuated by previous physical training ($p < 0.05$) (Table 2).

4. Discussion

The results of the present study indicate that previous physical training attenuated the renal damage induced by ADR in rats. Animals treated with ADR developed increased plasma creatinine levels, progressive albuminuria, enlargement of tubulointerstitial area of renal cortex, and mesangial area expansion in the glomerulus. They also presented inflammatory process in renal tissue (increased MCP-1 urinary excretion, IL-1 β in renal tissue and macrophage infiltration in tubulointerstitial area of the renal cortex), associated with increased fibronectin (a marker of fibrosis) expression in the renal cortex. It was also observed

Fig. 4. Immunolocalization of desmin in glomerulus from the SED + SAL (A), PhT + SAL (B), SED + ADR (C), and PhT + ADR (D) groups. Note that the expression of desmin at the glomerular edge is higher in (C) than in (D). Magnification $\times 400$. Bar indicates 20 μ m. Score for desmin expression at the glomerular edge (E) 60 days after saline or ADR injections. These data are expressed as median and interquartile ranges (25–75%). Western blot analysis of podocin and α_1 -tubulin (F) in renal cortex and outer medulla from SED + SAL (lane 1), PhT + SAL (lane 2), SED + ADR (lane 3) and PhT + ADR (lane 4) animals, 60 days after saline or ADR injections. Densitometry of podocin (G). A densitometric ratio between the densitometry of podocin and α_1 -tubulin was calculated and data are expressed in comparison to the control (SED + SAL), with the mean ($\pm$ SEM) control value designated as 100%. These data are expressed as mean $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$ compared with SED + SAL; # $p < 0.05$ compared with PhT + SAL; * $p < 0.05$ compared with SED + ADR. SED + SAL = sedentary + saline (n = 5–6); PhT + SAL = physical training + saline (n = 5–6); SED + ADR = sedentary + adriamycin (n = 6–7); PhT + ADR = physical training + adriamycin (n = 6–8).

Fig. 5. Immunolocalization of fibronectin in the renal cortex of rats from the SED + SAL (A), PhT + SAL (B), SED + ADR (C), and PhT + ADR (D) groups. Note that the expression of fibronectin is higher in tubulointerstitial area from the renal cortex in (C) than in (D). Magnification $\times 400$. Bar indicates 20 μm . Score for fibronectin expression (E) in the glomerulus and (F) in the tubulointerstitial area from the renal cortex of control and the experimental groups, 60 days after saline or ADR injections. Data are expressed as median and interquartile ranges (25–75%). ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ compared with SED + SAL; $^{\#}p < 0.01$ compared with PhT + SAL; $^{\circ}p < 0.05$ compared with SED + ADR. SED + SAL = sedentary + saline ($n = 6$); PhT + SAL = physical training + saline ($n = 6$); SED + ADR = sedentary + adriamycin ($n = 7$); PhT + ADR = physical training + adriamycin ($n = 8$).

desmin expression at the glomerular edge (an indicator of podocyte lesion) and decrease of podocin (component of podocytes) [47] content in renal tissue. These alterations were related to decreased VEGF and eNOS expressions and PTCs density (JG12 expression) in the renal cortical tubulointerstitium from these animals. These disturbances were less intense in rats from the PhT + ADR group.

The beneficial effect of previous exercise in the reduction in the serum creatinine levels was already observed in models of renal ischemic injury and in streptozotocin-induced diabetic rats [48,49]. Experimental evidence has shown the participation of proteinuria in the tubulointerstitial injury observed in this model [3]. Filtered protein can be toxic to tubule cells. In vitro studies using tubular cell cultures

showed that some proteins, such as IgG and albumin, induced increased the production of inflammatory and vasoactive factors by these cells [50,51]. Higher macrophage numbers in the tubulointerstitial area of the renal cortex and increased urinary MCP-1 and IL-1 β renal content were observed in ADR-treated animals, which was less intense in animals subjected to exercise training (PhT + ADR group); this group also presented lower albumin urinary excretion. Physical activity was also associated with a decreased number of macrophages in the pulmonary tissue in a study using an animal model of acute infection, and with reduced macrophage infiltration in diabetic atherosclerosis and arterial inflammation in older rats. These effects were related to lower levels of proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , as well as

Fig. 6. Immunolocalization of VEGF in the renal cortex from the SED + SAL (A), (B) PhT + SAL (B), SED + ADR (C), and PhT + ADR (D) groups. Note that the expression of VEGF is higher in the PhT + ADR (D) group than in the SED + ADR (C) group. Magnification $\times 400$. Bar indicates 20 μm . Score for VEGF expression in the tubulointerstitial area of the renal cortex from control and experimental groups, 60 days after saline or ADR injections. These data are expressed as median and interquartile ranges (25–75%). Western blot analysis of VEGF and α -tubulin (F) in renal cortex and outer medulla from SED + SAL (lane 1), PhT + SAL (lane 2), SED + ADR (lane 3) and PhT + ADR (lane 4) animals, 60 days after saline or ADR injections. Densitometry of VEGF (G). A densitometric ratio between the densitometry of VEGF and α -tubulin was calculated and data are expressed in comparison to the control (SED + SAL), with the mean ($\pm$ SEM) control value designated as 100%. These data are expressed as mean $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$ compared with SED + SAL; $^{\#}p < 0.05$ compared with PhT + SAL; $^{\circ}p < 0.05$ compared with SED + ADR. SED + SAL = sedentary + saline ($n = 5-6$); PhT + SAL = physical training + saline ($n = 5-6$); SED + ADR = sedentary + adriamycin ($n = 6-7$); PhT + ADR = physical training + adriamycin ($n = 6-8$).

Fig. 7. Immunolocalization of eNOS in the renal cortex of rats from the SED + SAL (A), PhT + SAL (B), SED + ADR (C), and PhT + ADR (D) groups. Note that the expression of eNOS is higher in the PhT + ADR (D) group than in the SED + ADR (C) group. Magnification $\times 400$. Bar indicates 20 μ m. Percentage of eNOS expression (E) in the tubulointerstitial area from the renal cortex of control and experimental groups, 60 days after saline or ADR injections. These data are expressed as median and interquartile ranges (25–75%). Western blot analysis of eNOS and α -tubulin (F) in renal cortex and outer medulla from SED + SAL (lane 1), PhT + SAL (lane 2), SED + ADR (lane 3) and PhT + ADR (lane 4) animals, 60 days after saline or ADR injections. Densitometry of eNOS (G). A densitometric ratio between the densitometry of eNOS and α -tubulin was calculated and data are expressed in comparison to the control (SED + SAL), with the mean ($\pm$ SEM) control value designated as 100%. These data are expressed as mean $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$ compared with SED + SAL; $^{*}p < 0.01$ and $^{*}p < 0.05$ compared with PhT + SAL; $^{*}p < 0.01$ and $^{*}p < 0.05$ compared with SED + ADR. SED + SAL = sedentary + saline (n = 5–6); PhT + SAL = physical training + saline (n = 5–6); SED + ADR = sedentary + adriamycin (n = 6–7); PhT + ADR = physical training + adriamycin (n = 6–8).

increased expression of antioxidant enzymes [52–54]. Our study showed higher fibronectin expression in renal cortex and increased interstitial relative area in ADR-treated rats, which were less intense in rats submitted to previous exercise. It was found that the renal tubular cells also undergo a transdifferentiation process after the capture of proteins, modifying their function and phenotype and starting to produce and release cytokines and other inflammatory substances, with increased inflammation and renal fibrosis [5]. Increased relative interstitial area was already observed on the 7th day with successive increases on the 14th and 28th days after ADR injection in mice [17]. Amaral et al. [55] demonstrated that physical training preconditioning on a treadmill reduced fibronectin expression in the glomerulus of

streptozotocin-induced diabetic female rats, showing that exercise has beneficial effects in attenuating the glomerulosclerosis. It was also shown that even after ADR injection, a swimming protocol of 60 min per day of exercise over 11 weeks reduced collagen deposition in the interstitial tissue of the kidney [56].

The podocyte lesion in ADR-treated rats was demonstrated by the increase in desmin expression at the glomerular edge and by decrease of podocin renal content, which were attenuated in PhT + ADR group. Desmin is a marker of podocyte damage [46]. The reduction in podocyte lesions in the PhT + ADR group can explain the decrease in albuminuria in these animals, since the podocytes are components of the glomerular filtration barrier [57,58]. It was observed injury of glomerular epithelial

Fig. 8. Immunolocalization of JG12 in the renal cortex of rats from the (A) SED + SAL, (B) PhT + SAL, (C) SED + ADR, and (D) PhT + ADR groups. Note that the expression of JG12 is higher in the PhT + ADR (D) group than in the SED + ADR (C) group. Magnification $\times 400$. Bar indicates 20 μ m. Score for JG12 expression (E) in the glomerulus and number of PTC (F) from renal cortex of control and experimental groups, 60 days after saline or ADR injections. Data are expressed as median and interquartile ranges (25–75%). ** $p < 0.01$ and $^{*}p < 0.05$ compared with SED + SAL; $^{*}p < 0.01$ and $^{*}p < 0.05$ compared with PhT + SAL; $^{*}p < 0.01$ compared with SED + ADR. SED + SAL = sedentary + saline (n = 6); PhT + SAL = physical training + saline (n = 6); SED + ADR = sedentary + adriamycin (n = 7); PhT + ADR = physical training + adriamycin (n = 8).

Table 2

Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and renal tissue levels of IL (interleukin) -1 β from sedentary and trained rats, 60 days after i.v. injection of saline or adriamycin.

	MCP-1 (pg/mg urinary creatinine)	IL-1 β (pg/mg prot)
SED + SAL	396 (180; 684)	8.7 (5.8; 9.5)
PhT + SAL	251 (172; 538)	6.7 (3.3; 9.3)
SED + ADR	3866 (2501; 5415)**	29.8 (16.9; 39.8)**
PhT + ADR	1812 (1181; 3120) ^{§*}	17.5 (8.7; 26.4) ^{§*}

SED + SAL = sedentary + saline (n = 6); PhT + SAL = physical training + saline (n = 6); SED + ADR = sedentary + adriamycin (n = 7); PhT + ADR = physical training + adriamycin (n = 8). Data are expressed as median and interquartile ranges (25–75%).

** p < 0.01 compared with SED + SAL.

[§] p < 0.05 compared with PhT + SAL.

* p < 0.05 compared with SED + ADR.

cells with podocyte fusion on the first day after ADR administration. However, glomerular endothelial cell injury damage preceded podocyte lesions in ADR-induced nephropathy [8]. VEGF is produced and expressed in podocytes and in tubular epithelial cells. VEGF receptors are localized in pre-glomerular, glomerular, and peritubular endothelial cells [59–61]. Kairaitis et al. [17] reported a reduction in VEGF expression in areas of tubular damage 7 days after the administration of ADR in a murine model, with subsequent reductions on the 15th and 28th days after injection. Using a remnant kidney model, Kang et al. [18] observed that loss of VEGF was related to a reduction in glomerular and PTC densities, glomerulosclerosis, and interstitial fibrosis. VEGF reduction can contribute to impaired angiogenesis and endothelial cell loss, leading to progressive renal scarring [18,62].

Aminopeptidase P (JG12) is a specific marker for the vascular endothelium, which is specifically expressed by the endothelial cells of the glomeruli and tubulointerstitial vessels from renal tissue [63]. In the present study, we evaluated PTC density using JG12 antigen, and we observed that the reduction of PTC density presented in ADR-treated rats was less intense in the renal cortex of the PhT + ADR group. The higher VEGF expression observed in the tubulointerstitial area of rats subjected to physical training before ADR injection may be responsible for this effect. In the remnant kidney model, the VEGF administration protected PTC endothelium by reducing capillary rarefaction and increasing capillary density, suggesting that VEGF plays an important role in angiogenesis and in maintaining the vascular endothelium [64].

Several studies have demonstrated that VEGF also stimulates NOS expression in endothelial cells, resulting in generation of bioactive NO [65,66]. The higher VEGF expression observed in the renal cortex of rats subjected to physical training before ADR injection may be related to the smaller eNOS expression decrease in tubulointerstitial area in the PhT + ADR group in our study. In the kidney, eNOS is expressed in renal arteries and arterioles, glomerular capillaries, and vasa recta [67], but it also has been detected in tubules [68], such as the proximal convoluted tubule [69], thick ascending limb of the loop of Henle [70], and inner medullary collecting duct [71]. Acting by increasing the shear stress in vessel walls, exercise promotes an increase in eNOS expression, resulting in increased endothelial NO production [72]. We did not observe these increases in PhT + SAL compared to SED + SAL groups, although physical training is associated with increases in eNOS and VEGF expressions. However, the evaluation was only performed in these animals 60 days after the training sections had finished.

5. Conclusion

Taken together, these data show that physical training prior to ADR injection reduced the renal damage induced by this drug. This effect was associated with an increased angiogenesis process, and attenuation of endothelial lesions, the inflammatory process, and fibrosis.

Conflict of interest

The authors declared that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to Flávio Henrique Leite, Guilherme de Paula Lemos, and Rubens Fernando de Melo for their expert technical assistance. This work was supported by a grant (2012/50180-2) from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). T.M.C. is the recipient of a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, DF, Brazil. C.M.F. received a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), H.D.C.F. from FAPESP (2013/23113-5), and L.C. from FAPESP (2013/21113-5).

References

- [1] S. Klahr, G. Schreiner, I. Ichikawa, The progression of renal disease, *N. Engl. J. Med.* 318 (25) (1988) 1657–1660.
- [2] V.W. Lee, D.C. Harris, Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis, *Nephrol.* 16 (1) (2011) 30–38.
- [3] E.A. Baroni, R.S. Costa, A.R. Volpini, T.M. Coimbra, Sodium bicarbonate treatment reduces renal injury, renal production of transforming growth factor- β , and urinary transforming growth factor- β excretion in rats with doxorubicin-induced nephropathy, *Am. J. Kidney Dis.* 34 (2) (1999) 328–337.
- [4] G. D'Amico, C. Bazzi, Pathophysiology of proteinuria. Pathophysiology of proteinuria, *Kidney Int.* 63 (3) (2003) 809–825.
- [5] K.S. Eardley, D. Zehnder, M. Quinkler, J. Leptenies, R.L. Bates, C.O. Savage, et al., The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease, *Kidney Int.* 69 (7) (2006) 1189–1197.
- [6] B. Rodríguez-Iturbe, H. Pons, J. Herrera-Acosta, R.J. Johnson, Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases, *Kidney Int.* 59 (5) (2001) 1626–1640.
- [7] H.Y. Lan, Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 12 (1) (2003) 25–29.
- [8] Y.B. Sun, X. Qu, X. Zhang, G. Caruana, J.F. Bertram, J. Li, Glomerular endothelial cell injury and damage precedes that of podocytes in adriamycin-induced nephropathy, *PLoS One* 8 (1) (2013) 1–12.
- [9] P. Ochodnický, R.H. Henning, R.P. van Dokkum, D. de Zeeuw, Microalbuminuria and endothelial dysfunction: emerging targets for primary prevention of end-organ damage, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47 (2) (2006) S151–S162.
- [10] T. Nakayama, W. Sato, T. Kosugi, L. Zhang, M. Campbell-Thompson, A. Yoshimura, et al., Endothelial injury due to eNOS deficiency accelerates the progression of chronic renal disease in the mouse, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 296 (2) (2009) F317–F327.
- [11] Y. Kanetsuna, K. Takahashi, M. Nagata, M.A. Gannon, M.D. Breyer, R.C. Harris, et al., Deficiency of endothelial nitric-oxide synthase confers susceptibility to diabetic nephropathy in nephropathy-resistant inbred mice, *Am. J. Pathol.* 170 (5) (2007) 1473–1484.
- [12] D.H. Kang, J. Kanellis, C. Hugo, L. Truong, S. Anderson, D. Kerjaschki, et al., Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (3) (2002) 806–816.
- [13] S. Möbius-Winkler, T. Hillberg, K. Menzel, E. Golla, A. Burman, G. Schuler, et al., Time-dependent mobilization of circulating progenitor cells during strenuous exercise in healthy individuals, *J. Appl. Physiol.* 107 (6) (2009) 1943–1950.
- [14] K. Doi, E. Noiri, T. Fujita, Role of vascular endothelial growth factor in kidney disease, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 8 (1) (2010) 122–128.
- [15] R. Ohashi, A. Shimizu, Y. Masuda, H. Kitamura, M. Ishizaki, Y. Sugisaki, et al., Peritubular capillary regression during the progression of experimental obstructive nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (7) (2002) 1795–1805.
- [16] Y.G. Kim, S.I. Suga, D.H. Kang, J.A. Jefferson, M. Mazzali, K.L. Gordon, et al., Vascular endothelial growth factor accelerates renal recovery in experimental thrombotic microangiopathy, *Kidney Int.* 58 (6) (2000) 2390–2399.
- [17] L.K. Kairaitis, Y. Wang, M. Gassmann, Y.C. Tay, D.C. Harris, HIF-1 α expression follows microvascular loss in advanced murine adriamycin nephrosis, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 288 (1) (2005) F198–F206.
- [18] D.H. Kang, A.H. Joly, S.W. Oh, C. Hugo, D. Kerjaschki, K.L. Gordon, et al., Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1, *J. Am. Soc. Nephrol.* 12 (7) (2001) 1434–1447.
- [19] M. Shibuya, Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases, *J. Biochem.* 153 (1) (2013) 13–19.
- [20] D. Veron, G. Villegas, P.K. Aggarwal, C. Bertuccio, J. Jimenez, H. Velazquez, et al., Acute podocyte vascular endothelial growth factor (VEGF-A) knockdown disrupts alpha V beta3 integrin signaling in the glomerulus, *PLoS One* 7 (7) (2012) 1–13.
- [21] M. Vilella, A. Vilella, Exercise and cardiovascular diseases, *Kidney Blood Press. Res.* 39 (2–3) (2014) 147–153.
- [22] D. Di Raimondo, A. Tuttolomondo, C. Buttà, A. Casuccio, L. Giarrusso, G. Miceli, et al., Metabolic and anti-inflammatory effects of a home-based programme of aerobic physical exercise, *Int. J. Clin. Pract.* 67 (12) (2013) 1247–1253.

- [23] P.M. Haram, O.J. Kemi, U. Wisloff, Adaptation of endothelium to exercise training: insights from experimental studies, *Front. Biosci.* 13 (2008) 336–346.
- [24] R.S. Luiz, K.A.S. Silva, R.R. Rampaso, E.L. Antônio, J. Montemor, D.S. Bocalini, et al., Exercise attenuates renal dysfunction with preservation of myocardial function in chronic kidney disease, *PLoS One* 8 (2) (2013) 1–7.
- [25] C. Groussard, M. Rouchon-Isnard, C. Coutard, F. Romain, L. Malardé, S. Lemoine-Morel, et al., Beneficial effects of an intradialytic cycling training program in patients with end-stage kidney disease, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 40 (6) (2015) 550–556.
- [26] D.T. Aolke, F. Baria, M.A. Kamimura, A. Ammirati, M.T. de Mello, L. Cuppani, Impact of home-based aerobic exercise on the physical capacity of overweight patients with chronic kidney disease, *Int. Urol. Nephrol.* 47 (2) (2015) 359–367.
- [27] L.F. DeFina, C.E. Barlow, N.B. Radford, D. Leonard, B.L. Willis, The association between midlife cardiorespiratory fitness and later life chronic kidney disease: the Cooper Center Longitudinal Study, *Prev. Med.* 31 (89) (2016) 178–183.
- [28] S.L. Amaral, P.E. Papanek, A.S. Greene, Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281 (3) (2001) H1163–H1169.
- [29] N.D. Da Silva Jr., T. Fernandes, U.P. Soci, A.W. Monteiro, A.J. Phillips, E.M. Oliveira, Swimming training in rats increases cardiac micro RNA-126 expression and angiogenesis, *Med. Sci. Sports Exerc.* 44 (8) (2012) 1453–1462.
- [30] L. Gliemann, R. Buess, M. Nyberg, H. Hoppele, A. Odriozola, P. Thaning, et al., Capillary growth, ultrastructure remodelling and exercise training in skeletal muscle of essential hypertensive patients, *Acta Physiol.* 214 (2) (2015) 210–220.
- [31] D. Ito, P. Cao, T. Kakihana, E. Sato, C. Suda, Y. Muroya, et al., Chronic running exercise alleviates early progression of nephropathy with upregulation of nitric oxide synthases and suppression of glycation in Zucker diabetic rats, *PLoS One* 10 (9) (2015) 1–21.
- [32] D. Ito, O. Ito, P. Cao, N. Mori, C. Suda, Y. Muroya, et al., Effects of exercise training on nitric oxide synthase in the kidney of spontaneously hypertensive rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 40 (2) (2013) 74–82.
- [33] D. Ito, O. Ito, N. Mori, P. Cao, C. Suda, Y. Muroya, et al., Exercise training upregulates nitric oxide synthases in the kidney of rats with chronic heart failure, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 40 (9) (2013) 617–625.
- [34] J.C. Ferreira, N.P. Rolim, J.B. Bartholomeu, C.A. Gobatto, E. Kokubun, P.C. Brum, Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34 (8) (2007) 760–765.
- [35] J.V. Felix, L.C. Michelini, Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarius, *Hypertension* 50 (4) (2007) 780–785.
- [36] R. Beneke, M. Hüttler, R.M. Leithäuser, Maximal lactate-steady state independent of performance, *Med. Sci. Sports Exerc.* 32 (6) (2000) 1135–1139.
- [37] R.R. Cunha, V.N. Cunha, P.R. Segundo, S.R. Moreira, E. Kokubun, C.S. Campbell, et al., Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats, *Cell Biochem. Funct.* 27 (6) (2009) 351–357.
- [38] F.B. Machado, C.A. Gobatto, R.V.L. Contarteze, M. Papoti, M.A.R. Mello, Maximal lactate steady state in running rats, *J. Exerc. Physiol.* 8 (4) (2005) 29–35.
- [39] G.G. Araújo, M. Papoti, I.G. dos Reis, M.A. de Mello, C.A. Gobatto, Physiological responses during linear periodized training in rats, *Eur. J. Appl. Physiol.* 112 (3) (2012) 839–852.
- [40] C.B. Laurell, Electroimmunoassay, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29 (124) (1972) 21–37.
- [41] H.N. Haugen, The determination of endogenous creatinine in plasma and urine, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 5 (1) (1953) 48–57.
- [42] C.D. Dijkstra, E.A. Dopp, P. Joling, G. Kraal, The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal, *Immunology* 54 (3) (1985) 589–599.
- [43] E.C.S. Marin, H.D.C. Francescato, C.G.A. Silva, R.S. Costa, T.M. Coimbra, Postnatal renal abnormalities in rats exposed to losartan during lactation, *Nephron Exp. Nephrol.* 119 (2011) e49–e57.
- [44] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [45] L.E. Barker, K.M. Shaw, Statistical commentary best (but oft-forgotten) practices: checking assumptions concerning regression residuals, *Am. J. Clin. Nutr.* 102 (3) (2015) 533–539.
- [46] T.M. Coimbra, U. Janssen, H.J. Gröne, T. Ostendorf, U. Kunter, H. Schmidt, et al., Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes, *Kidney Int.* 57 (1) (2000) 167–182 (2000).
- [47] S. Roselli, O. Gribouval, N. Boute, M. Sich, F. Benessy, T. Attié, et al., Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area, *Am. J. Pathol.* 160 (1) (2002) 131–139.
- [48] J. Lee, S. Park, W.K. Kim, Exercise preconditioning reduces acute ischemic renal injury in Hsp70.1 knockout mouse, *Histol. Histopathol.* 28 (9) (2013) 1223–1233.
- [49] K.A.S. Silva, R.S. Luiz, R.R. Rampaso, N.P. Abreu, E.D. Moreira, C.T. Mostarda, et al., Previous exercise training has a beneficial effect on renal and cardiovascular function in a model of diabetes, *PLoS One* 7 (11) (2012) 1–10.
- [50] L.G. Galli, R.A. Volpini, R.S. Costa, C.G. da Silva, T.M. Coimbra, Tubular cell lesion, albuminuria, and renal albumin handling in rats treated with adriamycin, *Ren. Fail.* 23 (5) (2001) 693–703.
- [51] M. Abbate, G. Remuzzi, Proteinuria as a mediator of tubulointerstitial injury, *Kidney Blood Press. Res.* 22 (1–2) (1999) 37–46.
- [52] C.R. Olivo, E.N. Miyaji, M.L. Oliveira, F.M. Almeida, J.D. Lourenço, R.M. Abreu, et al., Aerobic exercise attenuates pulmonary inflammation induced by *Streptococcus pneumoniae*, *J. Appl. Physiol.* 117 (9) (2014) 998–1007.
- [53] N.P. Kadoğlu, P. Moustardas, A. Kapelouzou, M. Katsimpoulas, A. Giagini, E. Dede, et al., The anti-inflammatory effects of exercise training promote atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E3 knockout mice with diabetic atherosclerosis, *Eur. J. Histochem.* 57 (1) (2013) 16–23.
- [54] L.A. Lesniewski, J.R. Durrant, M.L. Connell, G.D. Henson, A.D. Black, A.J. Donato, et al., Aerobic exercise reverses arterial inflammation with aging in mice, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301 (3) (2011) 1025–1032.
- [55] L.S.B. Amaral, F.A. Silva, V.B. Correia, C.E.F. Andrade, B.A. Dutra, M. Oliveira, et al., Beneficial effects of previous exercise training on renal changes in streptozotocin-induced diabetic female rats, *Exp. Biol. Med.* 241 (4) (2016) 437–445.
- [56] C.C. Peng, K.C. Chen, C.L. Hsieh, R.Y. Peng, Swimming exercise prevents fibrogenesis in chronic kidney disease by inhibiting the myofibroblast transdifferentiation, *PLoS One* 7 (6) (2012) 1–17.
- [57] Z. Wang, J. Liu, W. Sun, Effects of asiaticoside on levels of podocyte cytoskeletal proteins and renal slit diaphragm proteins in adriamycin-induced rat nephropathy, *Life Sci.* 93 (8) (2013) 352–358.
- [58] S.J. Shankland, The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis, *Kidney Int.* 69 (12) (2006) 2131–2147.
- [59] M. Simon, W. Röckl, C. Horrig, E.F. Gröne, H. Theis, H.A. Weich, et al., Receptors of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in fetal and adult human kidney: localization and [125I]VEGF binding sites, *J. Am. Soc. Nephrol.* 9 (6) (1998) 1032–1044.
- [60] B.F. Schrijvers, A. Ruyter, A.S. De Vries, The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology, *Kidney Int.* 65 (6) (2004) 2003–2017.
- [61] H. Dimke, M.A. Sparks, B.R. Thomson, S. Frische, T.M. Coffman, S.E. Quaggin, Tubulovascular cross-talk by vascular endothelial growth factor maintains peritubular microvasculature in kidney, *J. Am. Soc. Nephrol.* 26 (5) (2015) 1027–1038.
- [62] D.J. Kelly, C. Hepper, L.L. Wu, A.J. Cox, R.E. Gilbert, Vascular endothelial growth factor expression and glomerular endothelial cell loss in the remnant kidney model, *Nephrol. Dial. Transplant.* 18 (7) (2003) 1286–1292.
- [63] D. Sun, Y. Wang, C. Liu, X. Zhou, X. Li, A. Xiao, Effects of nitric oxide on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction, *Life Sci.* 90 (23–24) (2012) 900–909.
- [64] D.H. Kang, J. Hughes, M. Mazzali, G.F. Schreiner, R.J. Johnson, Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function, *J. Am. Soc. Nephrol.* 12 (7) (2001) 1448–1457.
- [65] A. Bouloumié, V.B. Schini-Kerth, R. Busse, Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells, *Cardiovasc. Res.* 41 (3) (1999) 773–780.
- [66] B.Q. Shen, D.Y. Lee, T.F. Zioncheck, Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a kdr/flk-1 receptor and a protein kinase c signaling pathway, *J. Biol. Chem.* 274 (46) (1999) 33057–33063.
- [67] S. Bachmann, H.M. Bosse, P. Mundel, Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 268 (5 Pt 2) (1995) F885–F898.
- [68] P.F. Mount, D.A. Power, Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis, *Acta Physiol.* 187 (4) (2006) 433–446.
- [69] A. Baines, P. Ho, Glucose stimulates O₂ consumption, NOS, and Na/H exchange in diabetic rat proximal tubules, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 283 (2) (2002) F286–F293.
- [70] C.F. Plato, E.G. Shesely, J.L. Garvin, eNOS mediates L-arginine-induced inhibition of thick ascending limb chloride flux, *Hypertension* 35 (2000) 319–323.
- [71] F. Wu, F. Park, A.W. Jr Cowley, D.L. Mattson, Quantification of nitric oxide synthase activity in microdissected segments of the rat kidney, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 276 (1999) F874–F881.
- [72] D.J. Green, A. Maiorana, G. O'Driscoll, R. Taylor, Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans, *J. Physiol.* 561 (2004) 1–25.

ANEXO

ANEXO A – Protocolo de ética experimental

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 001/2013, sobre o projeto intitulado “*Lesão endotelial e transdiferenciação epitélio mesenquimal (TEM) na evolução lesão renal induzida pela adriamicina: Influência do treinamento físico prévio.*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Terezila Machado Coimbra** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de maio de 2013.

We certify that the protocol nº 001/2013, entitled “*Glomerular endothelial cell injury and epithelial mesenchymal transition in the adriamycin-induced nephropathy: Influence of previous treadmill exercise*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 05/27/2013.

Ribeirão Preto, 27 de maio de 2013.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP