

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

BÁRBARA LUCIA PINTO COELHO

**EFEITOS PREVENTIVOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE OS
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS INDUZIDOS
A INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

CRICIÚMA, SETEMBRO DE 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

BÁRBARA LUCIA PINTO COELHO

**EFEITOS PREVENTIVOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE OS
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS INDUZIDOS
A INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinho

CRICIÚMA, SETEMBRO DE 2008

RESUMO

Introdução: Diversos estudos têm apontado que as complicações ocasionadas pela Insuficiência Renal Crônica (IRC) estão relacionadas com a produção excessiva de radicais livres e conseqüente estresse oxidativo. Os efeitos benéficos do exercício físico na IRC ainda apresentam resultados contraditórios, porém diversos estudos têm demonstrado que o exercício físico regular contribui para diminuir a gravidade de diversas doenças. **Objetivo:** Verificar os efeitos do exercício físico preventivo sobre a resposta oxidativa renal em ratos induzidos a IRC por nefrectomia. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 24 Ratos Wistar machos, divididos randomicamente em 4 grupos (n = 6): Sham, IRC, Sham-Ex e IRC-Ex. Os animais foram submetidos a um treinamento em esteira durante 8 semanas (até 1 Km/h e 50 min/dia, 5 dias/semana). Após 48 horas ao término do treinamento os animais foram submetidos a redução da massa renal (5/6 ablação da massa renal). Após trinta dias os animais foram sacrificados e o soro foi coletado para determinação de uréia e creatinina. O rim direito foi removido e congelado a -70°C para análise da produção de anion superóxido, enzimas antioxidantes (SOD e CAT), e danos oxidativos em lipídios (TBARS), proteínas (Grupo carbonil) e conteúdo de sulfidril. **Resultados:** Os resultados demonstraram aumento significativo nos níveis de creatinina e uréia, produção de anion superóxido, atividade enzimática antioxidante e danos oxidativos no grupo com IRC em relação ao Sham. O treinamento físico preventivo diminuiu a produção de anion superóxido e danos oxidativos no grupo com IRC, porém não aumentou as defesas antioxidantes. **Conclusão:** Os resultados do estudo mostram que o treinamento físico preventivo é capaz de melhorar a produção de oxidantes e os marcadores de danos oxidativos sem alterar a função renal e o sistema de defesa antioxidante.

Palavras-chave: Insuficiência renal crônica, estresse oxidativo e exercício físico.

ABSTRACT

Introduction: In recent studies have been shown that complications caused by CKD are related with the excessive production of free radicals and oxidative stress consequently. The beneficial effects of the physical exercise in CKD still present adversary results, but several studies have been demonstrating that patient that submit in regular programs of exercise present an increase of VO_2 max, control of the blood pressure, decrease in the insulin resistance, decrease of for-inflammatory cytokines, decrease of the cardiovascular risks, control of the anemia. **Objective:** To verify the effects of the preventive physical exercise on the response kidney oxidative in induced mice the chronic kidney disease for nephrectomy. **Materials and Methods:** The experimental groups consisted of twenty-four male wistar, randomly assigned to four groups (n = 6): Sham, CKD, Sham-Exercise and CKD-Exercise. The animals were trained for eight weeks in mat (16m/Minn for 50minn/Day, 5 days/Week). After 48 hours of the training end the animals were submitted a decrease of the renal mass (5/6 renal mass ablation). Thirty days after, the animals were sacrificed and the serum was collected for creatinine and urea determination. Right kidney was removed and frozen in $-70^{\circ}C$ for superoxide production analysis, antioxidants enzyme (SOD and CAT), and oxidative damage in lipid, protein and sulphhydrila content. **Results:** The results demonstrated significant increase in the creatinine levels and urea, production of superoxide anion, antioxidant enzymatic activity and oxidative damages in the group with CKD in relation to Sham. The preventive physical training reduced the production of superoxide anion and oxidative damages in the group with CKD, however it wasn't increased the antioxidant defenses. **Conclusion:** The results of the study show that the preventive physical training is capable to improve the markers oxidative damage and decrease oxidant production without altering the renal function and the system of antioxidant defense.

Key-words: chronic kidney disease, oxidative stress and physical exercise.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA	9
2.1 Insuficiência Renal Crônica	9
2.2 Radicais Livres, Espécies Reativas de Oxigênio	11
2.3 Danos oxidativos	14
2.4 Defesas Antioxidantes.....	16
2.5 Espécies Reativas de Oxigênio e Insuficiência Renal Crônica.....	17
2.6 Exercício Físico X Insuficiência Renal Crônica.....	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos	21
CAPÍTULO II	22
CAPÍTULO III	44
DISCUSSÃO GERAL.....	45
CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A Insuficiência Renal Crônica (IRC) é uma deficiência crônica e irreversível das funções renais, sendo consequência de várias nefropatias congênitas e adquiridas (glomerulares, tubulares ou intersticiais) (ZATZ, 2000). Consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins. Em sua fase inicial a IRC é caracterizada pelo desenvolvimento da uremia, um distúrbio metabólico causado pela presença de inúmeras toxinas que se acumulam no organismo e modificam as funções de vários sistemas e órgãos (BRENNER & RECTOR, 1997).

Dados epidemiológicos mostram que no Brasil a prevalência de pacientes que realizam programa crônico de diálise aumentou mais que o dobro nos últimos oito anos (JUNIOR, 2004). Pacientes com IRC que realizam hemodiálise têm diversas complicações, ocasionando alto índice de morbidade e mortalidade. Além da lesão renal, outras complicações como as cardiovasculares, neurológicas, respiratórias e musculares comprometem significativamente a qualidade de vida dos pacientes (HEIWE et al., 2005; CROWE et al., 2007).

Diversos estudos têm apontado que as complicações ocasionadas pela IRC estão relacionadas com a produção excessiva de Radicais Livres e conseqüentemente com estresse oxidativo (LIM et al., 2002; VAZIRI, 2004; JOHANSEN, 2005; RUTKOWSKI et al., 2006; CROWE et al., 2007; SHAH et al., 2007). O estresse oxidativo é uma manifestação bioquímica de agressão a biomoléculas e está associado a diversas complicações, tais como: cardiovasculares, neurológicas, endócrinas e musculares, entre várias outras (VAZIRI, 2004). A propensão de pacientes urêmicos a alterarem o estado oxidativo celular e os níveis de radicais livres, com conseqüente dano oxidativo, se dá pela

diminuição nas defesas antioxidantes, produção de toxinas urêmicas, hemodiálise, anormalidades metabólicas, má nutrição (CANAUD, 1999).

Os agentes farmacológicos e procedimentos de hemodiálise ainda predominam nos meios terapêuticos para o tratamento da IRC, contudo, outros recursos podem auxiliar a eficiência da ação farmacológica, como também diminuir sua dependência.

Um dos recursos terapêuticos atualmente muito investigado em diversas doenças é o exercício físico. Os efeitos benéficos do exercício físico na IRC ainda apresentam resultados contraditórios, porém diversos estudos têm demonstrado que pacientes que se submetem a programas regulares de exercício apresentam um aumento do $VO_{2máx}$, controle da pressão arterial, diminuição na resistência de insulina, diminuição de citocinas pró-inflamatórias, diminuição dos riscos cardiovasculares, controle da anemia (JOHANSEN, 2005; MOINUDDIN & LEEHEY, 2008; HEIWE et al., 2005).

Assim, através deste estudo espera-se contribuir para demonstrar os efeitos preventivos do treinamento físico sobre parâmetros de estresse oxidativo induzidos pela IRC. Além disso, os resultados poderão servir como subsídio para a prescrição de exercício e auxiliar na compreensão quanto aos mecanismos terapêuticos na fisiopatologia da IRC.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA

2.1 Insuficiência Renal Crônica

A IRC consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins. Em sua fase inicial a IRC é caracterizada pelo desenvolvimento da uremia, um distúrbio metabólico causado pela presença de inúmeras toxinas que se acumulam no organismo e modificam as funções de vários sistemas, entre os quais o endócrino e o metabólico (PRAXEDES, 2006).

Segundo Annuc (2001), os rins participam da manutenção da constância do meio interno, através de fino controle do volume, da osmolaridade, da concentração eletrolítica e dos íons ácidos, entre outras funções essenciais para a vida. Eliminam o excesso de toxinas exógenas e de produtos não voláteis do metabolismo do nitrogênio, como uréia e creatinina, e também regulam a composição eletrolítica e de líquidos dos compartimentos intracelulares, em decorrência da intensa troca de água e solutos através das membranas celulares.

Atualmente são apresentadas diversas classificações para IRC, na tentativa de distinguir seus estágios e comprometimentos. Segundo Harrison (2002), as classificações mais usadas são: a IRC compensada ou descompensada, que discrimina formas assintomática e sintomática; a global ou seletiva, que pode afetar simultaneamente todas as funções renais ou apenas uma função; IRC leve, moderada ou severa, que determina o grau de diminuição da filtração glomerular e ainda a IRC em remissão, estabilizada, progressiva ou agudizada como objetivo de definir o ritmo de evolução da doença base da insuficiência.

A evolução da função renal normal para a IRC progride para quatro estágios que se fundem: na reserva renal diminuída, em que a taxa de filtração glomerular (TFG) é cerca de 50% da normal, os valores da uréia e creatinina plasmáticas são normais e os pacientes assintomáticos; na insuficiência renal, em que a TFG é de 20% a 50% do normal, pode ocorrer poliúria e nictúria como resultado de uma concentração diminuída; na falência renal, a TFG é menor do que 20% a 25%, os rins não conseguem regular o volume e a composição de solutos, e os pacientes desenvolvem edemas, acidose metabólica e hipocalcemia; na doença renal terminal, a TFG é menor que 5% do normal, sendo este o estágio final da uremia (ROBBINS, 2005).

Os rins produzem e secretam uma série de peptídeos e hormônios que participam na regulação da hemodinâmica sistêmica e renal, como a renina, a angiotensina e a prostaglandina. Ainda produz a eritropoetina, importante hormônio estimulador na produção de hemácias, e participa do metabolismo mineral através da gliconeogênese em condições de jejum prolongado (PRAXEDES, 2006). A hipertensão arterial, acidose metabólica, osteodistrofia renal e anemia estão entre as doenças que mais freqüentemente acometem os doentes renais. Além disso, o doente renal apresenta com freqüência um estado de falta de energia, fadiga e depressão (CLYNE, 2005).

A Insuficiência Renal Crônica apresenta um conjunto de sinais e sintomas que constituem a síndrome urêmica. Essas manifestações clínicas são conseqüências ou está associado às doenças que evoluem com redução progressiva da filtração glomerular. Nas fases iniciais, as manifestações clínicas e laboratoriais são mínimas ou ausentes (TEPEL, 2003).

A manutenção de níveis funcionais apropriados em face de uma redução considerável da massa renal deve-se ainda a uma outra propriedade básica do parênquima renal: os néfrons remanescentes são capazes de adaptar-se à nova condição biológica, multiplicando em várias vezes seu ritmo de trabalho. Isso fica bastante claro quando se analisa o comportamento do ritmo de filtração glomerular (RFG) em face de reduções progressivas do parênquima renal em ratos (AGARWAL, 2005).

A característica fisiopatológica nos casos mais comuns de doença renal crônica é a perda dos néfrons. As lesões morfológicas destrutivas que levam o desaparecimento dos néfrons produzem uma queda da filtração glomerular e da capacidade de transporte tubular, evocando respostas compensatórias morfológicas e funcionais. Estas alterações são representadas em uma hipertrofia e hiperplasia dos néfrons remanescentes, que são capazes de adaptar-se à nova condição biológica, multiplicando em várias vezes seu ritmo de trabalho. Necessitando assim, aumentar a taxa de filtração para que ocorra a queda do ritmo de filtração glomerular total (HERLIHY & MAEBIUS, 2002).

2.2 Radicais Livres, Espécies Reativas de Oxigênio

O termo Radical Livre (RL) refere-se a átomo ou moléculas altamente reativos que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Sua produção está relacionada com o equilíbrio de valência na camada mais externa da molécula. Quando formados, os RL tendem a extrair elétrons de outras moléculas para alcançar um estado quimicamente mais estável e criam novas moléculas de RL (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Os RL são importantes para o organismo, pois eles agem como mediadores de várias funções celulares. Por exemplo, quando as células são agredidas por algum agente estressor (que também pode ser RL) elas acabam produzindo RL para combater estes agentes (POLIDORI et al., 2000). Embora esses processos sejam normais para a vida das células, a produção excessiva de ERO pode induzir danos a componentes celulares, entre eles ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos que quando em grande extensão podem levar à morte celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Geralmente de 2% a 5% do oxigênio utilizado na fosforilação oxidativa (STE) são desviados para a formação de RL. Porém, nem todos radicais livres formados nos sistemas biológicos são derivados do oxigênio. Outras moléculas como óxido nítrico, por exemplo, também levam à formação de RL.

É importante ainda destacar que durante a formação de RL e na cascata de degradação outras espécies reativas vão se formando, como por exemplo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlet (1O_2). Todos esses constituintes biológicos são denominados de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (MATSUO & KANEKO, 2000).

Na cadeia respiratória mitocondrial, os complexos I e III e oxidação da Ubiquinona são os principais locais conhecidos para a produção de superóxido e H_2O_2 . Isso é causado pela transição de um elétron da NADH e FADH para ubiquinona formando semiquinona, e o outro elétron forma o superóxido. O superóxido é rapidamente reduzido pela superóxido dismutase mitocondrial (SOD) à H_2O_2 . Quando um metal é catalizado pela reação de Fenton ou Haber-Weiss entre a dismutação de superóxido para H_2O_2 é formado o radical hidroxil (JI, 1999).

Adicionalmente, outros dois importantes eventos se destacam na produção de ERO, o processo inflamatório e a isquemia-reperfusão. O processo inflamatório resulta numa resposta aos agentes infecciosos ou a outros estímulos, em que células fagocíticas, principalmente neutrófilos e macrófagos, realizam um rápido consumo de oxigênio, processo conhecido como *respiratory burst*. Esse processo é uma das fontes de formação de superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, ácido hipocloroso e peroxinitrito (ILES, 2002). Além de apresentarem ação antitumoral, alguns destes intermediários reativos derivados do oxigênio participam diretamente da defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus, protozoários e fungos (BARREIROS, 2006).

O “*respiratory burst*” resulta da atividade da NADPH oxidase, uma enzima que catalisa a transferência de elétrons da NADPH para O_2 formando superóxido. Na presença da superóxido dismutase o superóxido é dismutado formando um importante agente microbicida, o peróxido de hidrogênio (ILES, 2002). O peróxido de hidrogênio pode ser catalisado pela mieloperoxidase, presente principalmente em neutrófilos, dando origem a uma toxina ainda mais potente na sua ação microbicida denominada de ácido hipocloroso (HOCl) (KONIG, 2002).

Uma vez formado, o HOCl tende a oxidar aminoácidos para síntese de cloraminas. O HOCl ainda reage com peróxido de hidrogênio formando oxigênio singlet (1O_2). Há ainda a possibilidade de formar radical hidroxil ($\cdot OH$) pela reação de Haber-Weiss (DALLE-DONNE, 2003).

Em processo de isquemia-reperfusão, a Xantina Oxidase (XO) catalisa a degradação do monofosfato de adenosina (AMP), levando ao aumento na produção de superóxido. Caso o fornecimento de energia não seja suficiente para produção de ATP (trifosfato de adenosina), o AMP, formado do ATP pela reação da adenilato

quinase, é degradada a hipoxantina. Em condições normais, a degradação de hipoxantina ocorre via xantina desidrogenase (Xdh) utilizando adenina dinucleotídeo como acceptor de elétrons (BARREIROS, 2006).

Porém, durante o trabalho muscular isquêmico, a diminuição do fluxo de oxigênio reduz a produção de ATP. Esse mecanismo aumenta a concentração de íons de Ca^+ na célula e ativa proteases intramusculares dependentes de Ca^+ , as quais estimulam a redução da Xdh e formando a XO. A XO converte a hipoxantina para xantina e ácido úrico usando o oxigênio molecular como receptor de elétrons, formando assim o ânion superóxido (JI, 1999).

2.3 Danos oxidativos

Um alvo clássico dos ataques dos RL são os ácidos graxos polinsaturados presentes nas membranas celulares e em lipoproteínas. O processo de oxidação resultante do ataque de RL sobre a membrana chama-se lipoperoxidação. Durante a lipoperoxidação, intermediários podem sofrer quebras gerando hidrocarbonetos de cadeia curta (etano, pentano), aldeídos (como o malonaldeído, 4-hidroxinonenal), epóxidos e outros produtos altamente citotóxicos. Como resultado da lipoperoxidação, as membranas sofrem alterações na fluidez e na permeabilidade, resultando em perda na homeostase e morte celular (MATSUO & KANEKO, 2001).

Segundo Halliwell & Gutteridge (2007), a lipoperoxidação consiste em três fases: iniciação, propagação e término. Na fase de iniciação (1), RL renova hidrogênio do ácido graxo insaturado produzindo um radical de lipídeo (L^{\bullet}), que ao reagir com o oxigênio molecular forma o radical peroxila (LOO^{\bullet}). Na propagação (2) o LOO^{\bullet} retira hidrogênio de outro lipídeo, formando o hidroperóxido de lipídeo

(LOOH) e $\cdot L$ e assim sucessivamente. Na fase terminal (3), os radicais produzidos se combinam formando um não-radical. O LOOH pode sofrer outras reações produzindo aldeídos e alcanos.

As proteínas também são alvo de ataque dos radicais livres. A oxidação dos aminoácidos resulta na formação de grupos carbonil, tióis oxidados, entre outras modificações que alteram a função normal da proteína (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Especificamente, os grupos carbonil são formados principalmente a partir da oxidação de alguns aminoácidos mediados por ROS, como lisina, argenina, prolina e treonina. Porém, reações secundárias de cadeias laterais de alguns aminoácidos (cisteína, lisina e histidina) com subprodutos da lipoperoxidação e da oxidação de carboidratos também formam grupos carbonil (DALLE-DONNE, 2003).

Está bem estabelecido que a oxidação de proteínas depende dos níveis de proteossomas intracelulares. De acordo com Davies & Shringarpure (2004), os danos em proteínas mediados por radicais livres e o acúmulo de proteínas oxidadas levam a um concomitante aumento na oxidação de proteínas, reduzindo a degradação de proteínas oxidadas. Proteases intracelulares são responsáveis por 70% a 80% da degradação de proteínas após a oxidação e esse mecanismo é essencial para os sistemas de reparo e antioxidantes. Assim, o proteossoma constitui uma parte importante do sistema de defesa antioxidante.

Outro alvo muito importante dos radicais livres é o DNA. A formação de radicais livres próximo ao DNA pode resultar na oxidação de bases de pirimidina e purina, e quebras na fita. Dentre as bases, a guanina é altamente sensível à oxidação (formação de 8-hidroxideoxiguanosina, 8-OhdG) mediado por radicais

livres. Essas alterações no DNA têm sido associadas com processos mutagênicos e carcinogênicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

2.4 Defesas Antioxidantes

Segundo Halliwell & Gutteridge (2007), as defesas antioxidantes podem atuar de forma associada ou independente por duas vias: 1) enzimáticas: este sistema é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPX). Essas enzimas são ativadas normalmente durante o metabolismo celular, porém suas atividades podem aumentar em função da presença de ERO.

Superóxido Dismutase (SOD): é a enzima responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença de próton H^+ . Sua composição apresenta diferentes grupos protéicos. Nos sistemas eucariontes, atualmente se conhecem duas formas: a) SOD-CuZn, que está presente principalmente no citosol; b) SOD-mn está localizada primariamente na mitocôndria (MATSUBARA & FERREIRA, 1997).

Catalase (CAT): é uma heme proteína citoplasmática e sua função é converter o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Está localizada, principalmente, no perioxossoma, entretanto, outras organelas como as mitocôndrias podem conter alguma atividade da CAT. Nos seres humanos é encontrada na maioria dos órgãos, tais como: fígado, cérebro, coração e músculo esquelético, medula óssea e mucosas e sua atividade é dependente de NAPH (SCOTT et al., 1991).

Glutathiona Peroxidase (GPX): é uma enzima selênio-dependente e age sobre H_2O_2 , convertendo-o em água, podendo agir também sobre os lipídeos

peroxidados, tornando-os hidroxilados e reverter a oxidação de proteínas. Após reagir com ERO, a GPX é convertida a glutathiona oxidada (GSSH), podendo ser reconvertida a glutathiona reduzida GSH, pela ação da enzima glutathiona redutase (FLOHE, 1982).

2) Não enzimáticas: que incluem as vitaminas E, C e betacaroteno, glutathiona (GSH), N-acetilcisteína (NAC), entre outros. Grandes partes desses antioxidantes são encontradas na alimentação e podem ser suplementados por uma dieta alimentar. A Vitamina E e betacaroteno são antioxidantes lipossolúveis e protegem as membranas celulares dos ataques por RL. A vitamina C e a glutathiona são hidrossolúveis e fundamentais na regeneração da Vitamina E e proteção dos constituintes lipídicos e protéicos celulares (URSO & CLAKSON, 2003).

2.5 Espécies Reativas de Oxigênio e Insuficiência Renal Crônica

O estresse oxidativo é uma manifestação comum em pacientes com IRC, levando as diversas complicações, tais como: cardiovasculares, neurológicas, endócrinas, musculares, entre várias outras (VAZIRI, 2004; RUTKOWSKI et al., 2006; CROWE et al., 2007). A propensão de pacientes urêmicos desenvolverem um alto nível de estresse oxidativo ocorre devido à associação entre excesso de produção de oxidantes e diminuição nas defesas antioxidantes, juntamente com as toxinas urêmicas, hemodiálise, anormalidades metabólicas e má nutrição (CANAUD, 1999; Rutkowski et al., 2006).

Um dos principais fatores que levam ao aumento de estresse oxidativo é a uremia (Rutkowski et al., 2006). A síndrome urêmica é atribuída à retenção de vários metabólicos, que em condições normais são eliminados pelos rins. Na IRC ocorre

um acúmulo destes compostos levando à síndrome urêmica. A toxicidade resultante da síndrome resulta em um gradual distúrbio fisiológico, bioquímico e danos em vários tecidos (LIM, et al., 2002; [VANHOLDER et al., 2006](#)).

Sabe-se que o LDL de pacientes urêmicos tem alta suscetibilidade de oxidação, sendo um indicador de aceleração de aterosclerose. O estresse oxidativo em pacientes urêmicos é caracterizado pelo acúmulo de grupos tióis e aldeídos oxidados, juntos com a diminuição dos grupos tióis reduzidos, diminuindo assim, em parte, as defesas antioxidantes. Em consequência da diminuição do catabolismo renal, ocorre acúmulo dos mediadores oxidantes urêmicos, favorecendo a disfunção endotelial e progressão da aterosclerose (HIMMERFALB, 2003).

O aumento na produção das ERO resulta em uma maior produção de compostos carbonil e lipoperoxidos, a qual reagem com proteínas modificando suas estruturas e funções levando à formação de produtos finais de glicação avançada (AGE) e produtos finais de lipoxidação avançada (MIYATA et al., 1998). O acúmulo destes produtos contribui para as complicações cardiovasculares, entre outras, em pacientes com IRC (VAZIRI, 2002).

O estudo de Pawlak et al (2008) demonstrou em seus resultados o aumento do estresse oxidativo correlacionado com o aumento do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em pacientes com IRC quando comparados com o grupo controle. Outro estudo mostrou que o estresse oxidativo tem papel fundamental como mediador de liberação de angiotensina II, estimulando a translocação de mRNA VEGF e expressão de proteína (FELIERS et al., 2006).

O LDL circulante entra no espaço subendotelial onde ocorre modificação oxidativa pelas células vasculares residentes como as células musculares lisas, células endoteliais e macrófagos. A LDL oxidada estimula a formação de “células

espumosas”, resultando em disfunção endotelial e dano, e as “células espumosas” perpetuam respostas inflamatórias recrutando macrófagos e linfócitos (DIAZ et al., 1997).

Himmerfalb et al. (2001) demonstraram que no plasma de pacientes que realizavam hemodiálise continham altos níveis de 3-clorotirosina, produto específico da reação catalisada pela mieloperoxidase, sugerindo importante função de fagocitose nas reações como causa do excesso de estresse oxidativo na uremia.

Ceballos-Picot et al. (1996) investigaram os níveis de glutathiona no plasma de pacientes com IRC, onde foi evidenciada diminuição nos níveis de glutathiona plasmática e grande diminuição na atividade da glutathiona peroxidase.

Hasdan et al. (2002) realizaram um estudo com ratos nefrectomizados 5/6 e avaliaram a pressão arterial e os níveis de ânion superóxido da parede arterial. Os resultados obtidos deste estudo foram um aumento da pressão arterial e formação do radical superóxido quando comparado com o grupo controle, levando a um aumento da disfunção endotelial devido à resistência do vaso. Outro estudo mostrou um notável aumento na pressão arterial e um significativo aumento na peroxidação lipídica em ratos com IRC acompanhado com o aumento de nitrotirosina em vários tecidos (VAZIRI et al., 2002).

2.6 Exercício Físico X Insuficiência Renal Crônica

As intervenções terapêuticas de rotina, especialmente as ações farmacológicas, têm contribuído significativamente para o tratamento das doenças, mas apresentam limitações. Acredita-se que o exercício físico regular exerça um efeito positivo sobre a resposta bioquímica na fisiopatologia de doenças,

possibilitando associar o exercício físico à insuficiência renal crônica, sendo ela uma doença progressiva e danosa ao metabolismo renal (PINHO et al., 2006; PRAXEDES, 2006).

Embora os benefícios do exercício físico sobre a função renal nos pacientes com IRC sejam limitados, os estudos mostram que a reabilitação renal bem sucedida exerce efeitos positivos e profundos sobre a capacidade física, aprimoramento funcional, disposição psicológica, melhora da auto-estima e melhor qualidade das inúmeras variáveis relacionadas à qualidade de vida (STUGART & WEISS, 1999).

Um estudo realizado por Storer et al (2005) mostrou que o exercício aeróbio (ciclismo) aumentou o pico de VO_2 , força, tempo de *endurance* e força do músculo quadríceps e diminuição da fadiga muscular. Outro estudo demonstrou que o ciclismo intra-diálise aumentou a força e função física dos pacientes, porém não foi observada mudança na massa muscular ou no fator de crescimento semelhante à insulina (MACDONALD et al., 2005).

Evidências mostram que o exercício aeróbio diminui a inflamação em pacientes com doenças crônicas e doenças coronarianas. Em pessoas saudáveis tem sido associada com o aumento da albumina sérica e diminuição de marcadores inflamatórios (FORD, 2002).

Como a inflamação está associada com a progressão da IRC (KALANTAR-ZADEH et al., 2003), e exercício físico está associado com a diminuição dos marcadores inflamatórios (FORD, 2002), e ainda o exercício físico pode minimizar a inflamação de pacientes com IRC.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos do exercício físico preventivo sobre a resposta oxidativa renal em ratos induzidos a insuficiência renal crônica por nefrectomia.

3.2. Objetivos Específicos

1. Verificar o efeito do exercício físico preventivo sobre a função renal pelo modelo de indução renal;
2. Verificar o efeito do exercício físico preventivo sobre a produção de superóxido pelo modelo de indução renal;
3. Verificar o efeito do exercício físico preventivo sobre atividade antioxidante enzimática pelo modelo de indução renal;
4. Verificar o efeito do exercício físico preventivo sobre os parâmetros de dano oxidativo pelo modelo de indução renal.

CAPÍTULO II

**PREVENTIVE PHYSICAL EXERCISE IMPROVE OXIDATIVE STRESS
PARAMETERS IN CHRONIC KIDNEY DISEASE**

Submitted to Kidney International

**PREVENTIVE PHYSICAL EXERCISE IMPROVE OXIDATIVE STRESS
PARAMETERS IN CHRONIC KIDNEY DISEASE**

Bárbara Coelho; Luís G. C. Rocha; Karoline Scarabellot; Débora L. Scheffer; Paulo
C.L. Silveira; Luciano A. Silva; Cláudio T. Souza; Ricardo A. Pinho

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/PPGCS/UNESC

Address:

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/UNESC

Av. Universitária, 1105 – Bairro Universitário

88806-000 - Criciúma – SC – Brazil

E-mail: pinho@unesc.net

ABSTRACT

Background: Reactive oxygen species (ROS) play an important role in the pathogenesis of Chronic Kidney Disease (CKD) and physical exercise may be useful with impaired oxidative defense mechanism. The aim this study was to verify preventive physical training effects on the oxidative stress parameters in animals induced to CKD.

Methods: Twenty-four male Wistar rats were divided into four groups (n=6): Sham, Sham plus exercise, CKD, CKD plus exercise. The exercise groups were submitted to physical training in treadmill for 8 weeks (until 1Km/h for 50 min/day, 5 days/week). Forty-eight hours after the last session of exercise, surgical reduction of renal mass (5/6 nephrectomized). Thirty days after the blood was collected for determination of serum creatinine and urea concentration and the right kidney was surgically removed and stored at -70°C to measure superoxide production, antioxidants enzymes (SOD and CAT) and oxidative damage in lipids (TBARS level) and protein (carbonyl groups and sulfhydryl content).

Results: The results show significant increase in creatinine and urea levels, superoxide production, antioxidants enzymes and oxidative damage in CKD group in relation to Sham-operate ($p<0.05$). The physical training prevented the superoxide production and decrease the oxidative damage in CKD group ($p<0.05$) but it didn't increase the antioxidant defenses.

Conclusion: The results of present study show that preventive physical training is capable of improving the oxidative stress parameters without altering the renal function and antioxidant defense system.

Key words: Chronic Kidney Disease; physical exercise, physical training; oxidative stress; reactive oxygen species; oxidative damage.

INTRODUCTION

Kidney diseases are a serious and prevalent health problem and their manifestation includes changes in renal detoxification capacity, deregulation of salt and water balance and alteration of endocrine functions, exerting a significant impact on the patient's short- or long-term survival. The pathophysiological spectrum of kidney diseases is broad (1).

The Chronic Kidney Disease (CKD) is one important clinical manifestation that is characterized by progressive loss of nephrons caused by increased intraglomerular pressure and hyperfiltration (2). Although the biochemical basis of CKD complications is mostly known, the pathogenesis of kidney disease in molecular/biochemical terms are yet to be fully elucidated (3).

CKD is accompanied by very complex long-term manifestations such as accelerated aging, atherosclerosis, heart disease, polyneuropathies and amyloidosis, which may be related to the hyper-production of free radicals (4).

Recently, accumulating experimental evidence has shown that reactive oxygen species (ROS) play a key role in the pathophysiological pathways of a wide variety of clinical and experimental renal diseases (5-6). This is especially relevant for the kidney in which a spectrum of seemingly unrelated disorders, from minimal change nephrotic syndrome to obstructive nephropathy, involves ROS (7).

CKD patients are subject to increased oxidative stress as a result of reduced anti-oxidant systems and increased pro-oxidant stimulus (8-9). Vaziri (5) suggested that pro-oxidant stimuli are attributed to the effects of uremic toxins, angiotensin 2, proinflammatory cytokines, blood–dialyzer interaction, reaction to catheters and

arteriovenous grafts, iron overload, chronic infections and underlying immunological or metabolic disorders, such as diabetes.

Routine therapeutic interventions, especially pharmacological and hemodialysis treatments, have been contributing significantly to decrease the condition's severity. It is believed that preventive physical training can exert a positive effect on the oxidative parameters of the kidney.

Although the benefits of physical exercise on the kidney's function are limited, physical training can be an important component in the treatment of CKD. According to Pechter (10), Moinuddin and Leehey (11), exercise conditioning has been shown to have a positive influence on physical capacity, hypertension, left ventricular function, lipid and glucose metabolism, oxidative status, anemia and quality of life in CKD patients and in patients on renal replacement therapy. Further, no investigation has verified the effects of preventive physical training on renal disease, especially on oxidative parameters. Most studies have shown exercise as therapeutic resource in the treatment of disease (10-12). Thus, the aim this study was to verify preventive physical training effects on the oxidative stress parameters in animals induced to CKD.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Twenty-four male, 2-3 months old Wistar rats, weighing 250-300 g, were used and cared for according to the European Communities Council Directive of 24 November 1986. Food (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Brazil) and water were available ad libitum and the animals were periodically checked to verify their pathogen-free condition. The room was kept at 70% humidity/20±2°C on a 12-h

light/dark cycle with lights on at 06:00 a.m. The animals were randomly assigned to four groups (n = 6 per group): Sham, Sham plus exercise, CKD, CKD plus exercise.

Exercise protocol: all groups were habituated on a nine-channel motor-drive treadmill with the speed of 10 m/min for 10 min/day during one week to reduce their stress to the new environment. The mice did not receive any stimuli to run. The exercise groups performed an incremental running program to obtain progressive levels of intensity during eight weeks for five days/week for a total period of 40 days (Table 1). The untrained animals were put on the switched-off treadmill during the same eight weeks as the exercise-trained groups.

CKD protocol: Forty-eight hours after the last session of exercise, surgical reduction of renal mass was performed in one step, under anesthesia with pentobarbital sodium (50 mg/kg, i.p.), by removal of the left kidney and infarction of two-thirds of the right kidney by closure of two or three branches of the right renal artery (13). Sham-operated rats underwent anesthesia and manipulation of the renal pedicles without renal mass reduction. After recovering from anesthesia, the animals were returned to their original cages, which were heated during the following 24 h.

Sacrifice Protocol: Thirty days after renal ablation, the rats were anesthetized with 50 mg/kg i.p. pentobarbital sodium, and blood was collected from the abdominal aorta for determination of serum creatinine and urea concentration. The left kidney was surgically removed, aliquoted and stored at -70°C for later analysis.

Biochemical Assays

Creatinine and urea: Creatinine and urea were determined in serum using a specific kit obtained from Labtest Diagnóstica SA, Brazil. The readings were made from the enzymatic system on, by kinetic method, according to the technical instructions provided with the referred kit and they were expressed in mg/dL serum.

Superoxide assay: Superoxide was measured by the method of McCord et al (14) and was expressed in nmol/min/mg protein. It was measured in the kidney through the rate of adrenaline oxidation read from the absorbance at 480 nm.

Superoxide Dismutase (SOD) activity assay: SOD activity of the kidney was determined according to the method of Bannister and Calabrese (15). The enzymatic activity estimation occurs by adrenaline auto-oxidation inhibition read at 480 nm in a spectrophotometer. Enzyme activity was expressed as U/mg protein.

Catalase (CAT) activity assay: In order to determine CAT activity, the kidney was sonicated in a 50 mM phosphate buffer and the resulting suspension was centrifuged at 3000 g for ten minutes. The supernatant was used for enzyme assay. CAT activity was measured by the rate of decrease in hydrogen peroxide absorbance at 240 nm (16). Enzyme activity was expressed as U/mg protein.

Lipid peroxidation assay: The 2-thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels were measured by the method of Draper and Hadley (17) and expressed as malondialdehyde (MDA) equivalent. Briefly, the kidney was mixed with 1 ml 10% trichloroacetic acid and 1 ml of 0.67% thiobarbituric acid; subsequently, they were heated in boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by measuring absorbance at 532 nm and the results are given as nmol MDA/mg protein.

Carbonyl assay: The protein concentration of the soluble protein fractions was determined according to Levine et al (18). Protein carbonyl content was measured by

first forming labeled protein hydrazone derivatives using 2,4-dinitrophenylhydrazide (DNPH). These derivatives were sequentially extracted with 10% (vol/vol) trichloroacetic acid followed by treatment with ethanol/ethylacetate, 1:1 (vol/vol) and reextraction with 10% trichloroacetic acid. The resulting precipitate was dissolved in 6 M urea hydrochloride. The difference spectrum between a 2,4-dinitrophenylhydrazide protein blank was used to calculate nmol of 2,4-dinitrophenylhydrazide incorporated per mg of protein. Results are shown for each sample read at 370 nm in a spectrophotometer.

Sulfhydryl content assay: The total thiol content was determined using the 5,5` - dithiobis (2-nitrobenzoic acid) method (DTNB) (Sigma). The reaction was started by adding 30 μ l of 10 mM DTNB stock solution to PBS. Control samples did not include DTNB. After 30 min of incubation at room temperature, absorbance at 412 nm was measured and the amounts of TNB formed were calculated (equivalent to the amount of SH groups) using the Aksenov technique (19).

Protein measurement: Protein concentration was estimated by the method of Lowry et al (20), using bovine serum albumin as standard.

Statistical analyses: Mean \pm S.E.M. were calculated, and multiple comparisons were performed by using one-way ANOVA with Tukey post-hoc tests. A p value <0.05 was considered significant. The software used for data analysis was the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 12.0 for Microsoft Windows.

RESULTS

Effect of CKD protocol and preventive physical training on creatinine and urea levels:

According to Table 2, the CKD protocol produced a significant increase in creatinine and urea levels when compared to the control group ($p < 0.05$). The physical training did not alter these values ($p < 0.05$).

Preventive effect of physical training on renal superoxide production:

According to Figure 1, the CKD protocol produced a significant increase in superoxide production in the kidney when compared to the sham group ($p < 0.05$). Physical training did not alter these values but it prevented that superoxide production increased when exposed to CKD ($p < 0.05$).

Preventive effect of physical training on antioxidant enzymes (SOD and CAT):

As shown in Figure 2A, SOD activity was higher in the kidney homogenates ($p < 0.05$) in the CKD group when compared to the control group, whereas the exercise plus CKD group decreased superoxide production in relation to the CKD group ($p < 0.05$). CAT activity (Figure 2B) was also increased in the CKD group ($p < 0.05$), while the exercise groups did not alter values in relation to the sham group ($p < 0.05$).

Preventive effect of physical training on oxidative damage markers:

TBARS formation was evaluated to obtain an index of lipoperoxidation and carbonyl content formation as an index of protein oxidation. As shown in Figures 3A and 3B, the CKD group had an increased TBARS level and protein oxidation ($p < 0.05$) when compared to the sham group, and these values were reduced with preventive physical training

($p < 0.05$). In addition, only the CKD group showed a decrease in the total thiols content when compared to the sham group ($p < 0.05$) (Figure 4).

DISCUSSION

Several studies show evidence of the presence of increased oxidative stress in CKD (21,22,23,24,25). However, there is limited correlative and cause–effect information about the role of oxidants in progressive kidney disease. In the present study, we hypothesized that preventive physical training can reduce the effects of chronic kidney disease on oxidative stress parameters.

We evaluated urea and creatinine as markers of renal function and their levels reflect the status of the kidney function (26). According Table 2, the animals with renal mass reduction show increased urea and creatinine levels, and these values were not altered by physical training. The increase shown in the CKD group is due to altered renal function by renal mass reduction (27). It is possible that the maintenance of the high levels of creatinine and urea after the training program is due to the renal lesion and not to the effect of exercise, since the time elapsed between the end of training program and the animals' sacrifice is enough for reducing the presence of subproducts formed during the creatine and proteic catabolism. Acute exercise causes proteinuria and subsequent reductions in both the renal blood flow and glomerular filtration rate (28). However, the physical training improved the renal function, especially in patients with CKD (28) and rats with renal ablation (29). Similarly, because appropriate animal models are few, there is no definite conclusion as to whether exercise training has any renal protective effect.

Several studies have shown an increase in ROS in CKD (5,21,22,30). Renal sources for ROS are activated macrophages, vascular cells, and various glomerular cells (6). This suggests that the kidney may be particularly susceptible to oxidative stress. Additional studies demonstrated that the physical exercise improves the antioxidant defense system and the resistance of tissue to oxidative damage (31,32,33). Thus, an efficient endogenous or exogenous antioxidant defense system is necessary to neutralize the deleterious effects caused by excessive ROS in CKD.

In the present study, the increase in superoxide production observed in the CKD group (Figure 1) was accompanied by a significant increase in SOD (Figure 2A) and CAT (Figure 2B) activities. However, the animals exposure to preventive physical training shows a decrease in superoxide production and antioxidant enzyme activities. Studies with humans (24,34,35,36) and animals (37,38) have been showing that renal diseases increase oxidants production, suggesting an involvement of oxidants in the progression of disease (39). The studies still suggest a low activity of antioxidant enzymes in renal disease (5,25). It is possible that the difference observed between the studies is associated with the methodology utilized for determining enzymatic activity. In addition, we believe that the increase in both CAT and SOD in rats with CKD observed in the present study is due to the response of the antioxidant defense system against superoxide production. Even so, although the antioxidant enzymes were increased, they were not enough for preventing the oxidative damages in lipids and protein (Figure 3A and 3B) and the decrease of thiols content (Figure 4). As physical exercise did not alter the renal enzymatic defense system, it is possible that the reduction in superoxide production might be related with upregulation of uncoupling mitochondrial protein or simply accelerating electron transport by increasing ADP supply. In other words, ADP tends to produce fewer

ROS when the electron transport chain is running fast (40). This can explain the low activity of SOD and CAT in animals previously trained.

Increased oxidative damage in lipids (Figure 3A) and proteins (Figures 3B and 4) in CKD suggest the role of oxidative stress in the pathogenesis of disease. The accumulation of lipoperoxidation products associated with carbonyl overload (carbonyl stress), caused by excess oxidative formation of reactive carbonyl groups in proteins, lipids and carbohydrates, and the irreversible protein modifications might have a significant role in long-term complications associated with CKD (23). However, the positive effects of physical training on oxidative damage in lipids and protein observed in the present study is associated with a decrease in oxidants in trained animals. Although exercise did not increase the antioxidant defense enzymes, their effects on superoxide production might have been decisive for the reduction of oxidative damages.

The excessive ROS production in CKD also is characterized from a biochemical point of view as a state of reactive aldehyde and oxidized thiol group accumulation, together with depletion of reduced thiol groups, which are particularly important as part of antioxidant defense (41,40). Thus, the reduction of thiol content observed in the present study may synergistically alter the redox balance and accelerate the progression of the disease.

In conclusion, the potential involvement of ROS in the pathogenesis of CKD suggests that free-radical scavengers and antioxidants might have therapeutic uses. Although there is significant experimental evidence demonstrating the therapeutic effects of physical training in animal and human models, the clinical evidence for such protection is relatively scarce and/or controversial. However, the results of present study show that preventive physical training is capable of improving the

oxidative stress parameters without altering the renal function and antioxidant defense system.

Acknowledgments

This research was supported by grants from CNPq/MCT (Brazil), CAPES/MEC (Brazil) and UNESC (Brazil).

References

1. Perco P, Pleban C, Kainz A, *et al.* Protein biomarkers associated with acute renal failure and chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest* 2006; **36**: 753–763.
2. Yamashita C, Tazawa N, Ohkita M. Exaggerated Renal Pathology of Partial Ablation-Induced Chronic Renal Failure in eNOS Deficient Mice. *Biol. Pharm. Bull* 2008; **31**: 1029-1031.
3. Selvaraj N, Bobby, Kumar AD. An evaluation of level of oxidative stress and protein glycation in nondiabetic undialyzed chronic renal failure patients. *Clin Chim Acta* 2002; **324**: 45–50.
4. Mandal AK, Woodi M, Sood V. Quantitation and characterization of glutathionyl haemoglobin as an oxidative stress marker in chronic renal failure by mass spectrometry. *Clin Biochem* 2007; **40**: 986-94.
5. Vaziri ND. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; **13**: 93-99.
6. Shah SV, Baliga R, Rajapurkar M, *et al.* Oxidants in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; **18**: 16–28.

7. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996; **21**: 845-853.
8. Erdogan C. The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 2002; **322**: 157–161.
9. Gallardo JM, Prado-Urbe M, Amato D. Inflammation and oxidative stress markers by pentoxifylline treatment in rats with chronic renal failure and high sodium intake. *Arch Med Res* 2007; **38**: 34-38.
10. Pechter U. Regular low-intensity aquatic exercise improves cardiorespiratory functional capacity and reduces proteinuria in chronic renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**: 624.
11. Moinuddin I, Leehey DJ. A comparison of aerobic exercise and resistance training in patients with and without chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2008; **15**: 83-96.
12. Adams G, Zhan C, Haddad F. Voluntary Exercise during Chronic Renal Failure in Rats. *Med Sci Sports Ex* 2005; **37**: 557-62.
13. Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, *et al.* Chronic inhibition of nuclear factor-B attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: 92–99.
14. Mccord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; **244**: 6049–6055.
15. Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD. *Meth Biochem Anal.* 1987; **32**: 279-312.
16. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 1984; **105**: 121-126.

17. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol.* 1990; **186**: 421-431.
18. Levine RL, Garland D, Oliver CN, *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 1990; **186**: 464-478.
19. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; **302**:141-145.
20. Lowry OH, Rosebough NG., Farr AL, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; **193**: 265-275.
21. Goeddeke-Mericke CM. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Rev Adv Chronic Kidney Disease* 2005; **12**: 326-334.
22. Campese VM, Sindhub RS, Yea S, *et al.* Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain. *Res Rep* 2007; **1134**: 27-32.
23. Miyata T, Ueda Y, Izuhara Y. Accumulation of carbonyls accelerates the formation of pentosidine, an advanced glycation end product: Carbonyl stress in uremia. *J Am Soc Nephrol* 1998; **9**: 2349-2356.
24. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, *et al.* Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004; **65**: 1009–1016.
25. Sindhu RK, Ehdai A, Farmand F, *et al.* Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Bioch Biophysica Acta* 2005; **1743**: 86–92.

26. [Fujihara CK](#), [Sena CR](#), [Malheiros DM](#), *et al.* Short-term nitric oxide inhibition induces progressive nephropathy after regression of initial renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; **290**: 632-40.
27. Fujihara CK, Antunes GR, Mattar A. Chronic inhibition of nuclear factor-KB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: 92–99.
28. Johansen KL. Exercise and Chronic Kidney Disease Current Recommendations. *Sports Med* 2005; **35**: 485-499.
29. [Kanazawa M](#), [Kawamura T](#), [Li L](#), *et al.* Combination of Exercise and Enalapril Enhances Renoprotective and Peripheral Effects in Rats With Renal Ablation. [Am J Hypertens](#) 2006; **19**: 80–86.
30. Agarwal R. On the nature of proteinuria with acute renal injury in patients with chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **288**: 265-71.
31. [Pinho R](#), [Andrades ME](#), [Oliveira MR](#), *et al.* Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int* 2006; **30**: 848-53.
32. Radak Z, Kumagai S, Taylor AW, *et al.* Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007; **32**: 942-6.
33. Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; **58**: 2571–2578.
34. Lin JL, Lin-Tan DT, Hsu KH, *et al.* Environmental lead exposure and progression of chronic renal diseases in patients without diabetes. *N Engl J Med* 2003; **348**: 277–286.

35. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, *et al.* Early prediction of IgA nephropathy progression: Proteinuria and AOPP are strong prognostic markers. *Kidney Int* 2004; **66**: 1606–1612.
36. Agarwal R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin II blockade *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; **284**: 863–869.
37. Kuo HT, Kuo MC, Chiu YW, *et al.* Increased glomerular and extracellular malondialdehyde levels in patients and rats with focal segmental glomerulosclerosis. *Eur J Clin Invest* 2005; **35**: 245–250.
38. Haugen E, Nath KA. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif* 1999; **17**: 58–65.
39. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radical in Biology Medicine. (University Press). Oxford NY .2007.
40. Himmelfarb J, Macmenamin E. Plasma aminothiols oxidation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2002; **61**:705-716.
41. Galli F, Floridi AG, Floridi A, *et al.* Accumulation of vitamin E metabolites in the blood of renal failure patients. *Clin Nutr* 2004; **23**: 205–212.

Table and Figure Legends

Table 1: The treadmill running program performed by male Wistar rats before of Chronic Kidney Disease.

Table 2: Urea and creatinine levels in serum. Data are express as means \pm EPM. $p < 0.05$, *different from Sham-operated.

Figure 1: Anion superoxide production: Data are express as means \pm EPM. $p < 0.05$, *different from Sham-operated and # different from CKD. Sham = Sham-operated; CKD = Chronic Kidney Disease; Sham-Ex = Sham-operated plus exercise; CKD-Ex = Chronic Kidney Disease plus exercise.

Figure 2: Superóxide dismutase (2A) and Catalase (2B). Data are express as means \pm EPM. $p < 0.05$, *different from Sham-operated and # different from CKD. Sham = Sham-operated; CKD = Chronic Kidney Disease; Sham-Ex = Sham-operated plus exercise; CKD-Ex = Chronic Kidney Disease plus exercise.

Figure 3: TBARS levels (3A) and protein carbonyl levels (3B). Data are express as means \pm EPM. $p < 0.05$, *different from Sham-operated and # different from CKD. Sham = Sham-operated; CKD = Chronic Kidney Disease; Sham-Ex = Sham-operated plus exercise; CKD-Ex = Chronic Kidney Disease plus exercise.

Figure 4: Total Thiois content. Data are express as means \pm EPM. $p < 0.05$, *different from Sham-operated and # different from CKD. Sham = Sham-operated; CKD = Chronic Kidney Disease; Sham-Ex = Sham-operated plus exercise; CKD-Ex = Chronic Kidney Disease plus exercise.

Weeks	Days	Velocity (Km/h)	Inclination (%)	Time (min)	
Adaptation	1-5	0.6	0	10	
1	1-5	0.8	0	20	
2	1-5	0.8	0	30	
3	1-5	0.8	0	40	
4	1-5	0.8	0	50	Table 1:
5	1-5	1.0	0	40	
6	1-5	1.0	0	50	
7	1-5	1.0	0	50	
8	1-5	1.0	0	50	

Table 1: The treadmill running program performed by male Wistar rats before of Chronic Kidney Disease. (n=6)

Table 2: Urea and creatinine levels in serum.

Groups (n=6)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Sham	60.04±1.14	0.35±0.05
CKD	97.29±5.79*	0.62±0.01*
Ex-Sham	62.37±4.21	0.28±0.04
Ex-CKD	73.79±3.56	0.46±0.01

Note: Values are presented as mean±SEM

* Significant difference as compared to sham

Sham = Sham-operated; CKD = Chronic Kidney Disease; Ex-Sham = Exercise plus sham-operated; Ex-CKD = Exercise plus Chronic Kidney Disease.

Figure 1

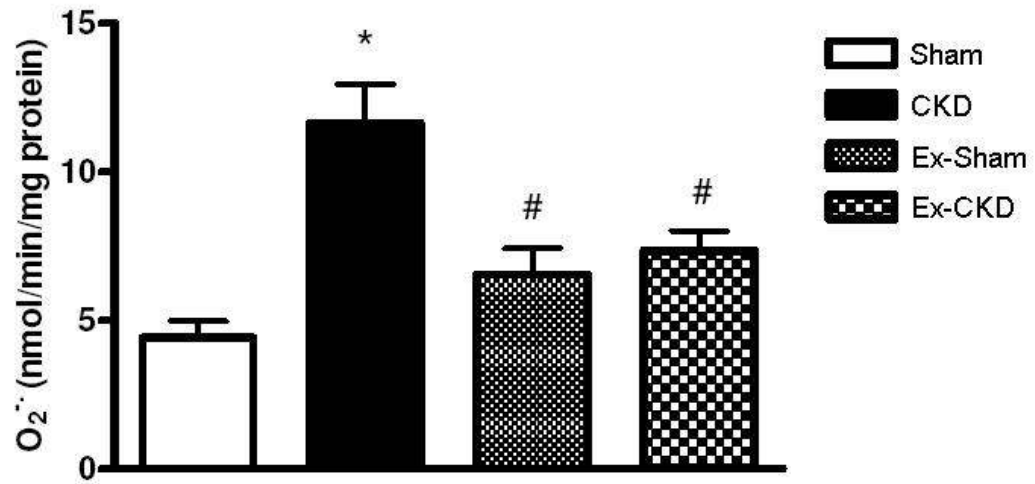


Figure 2

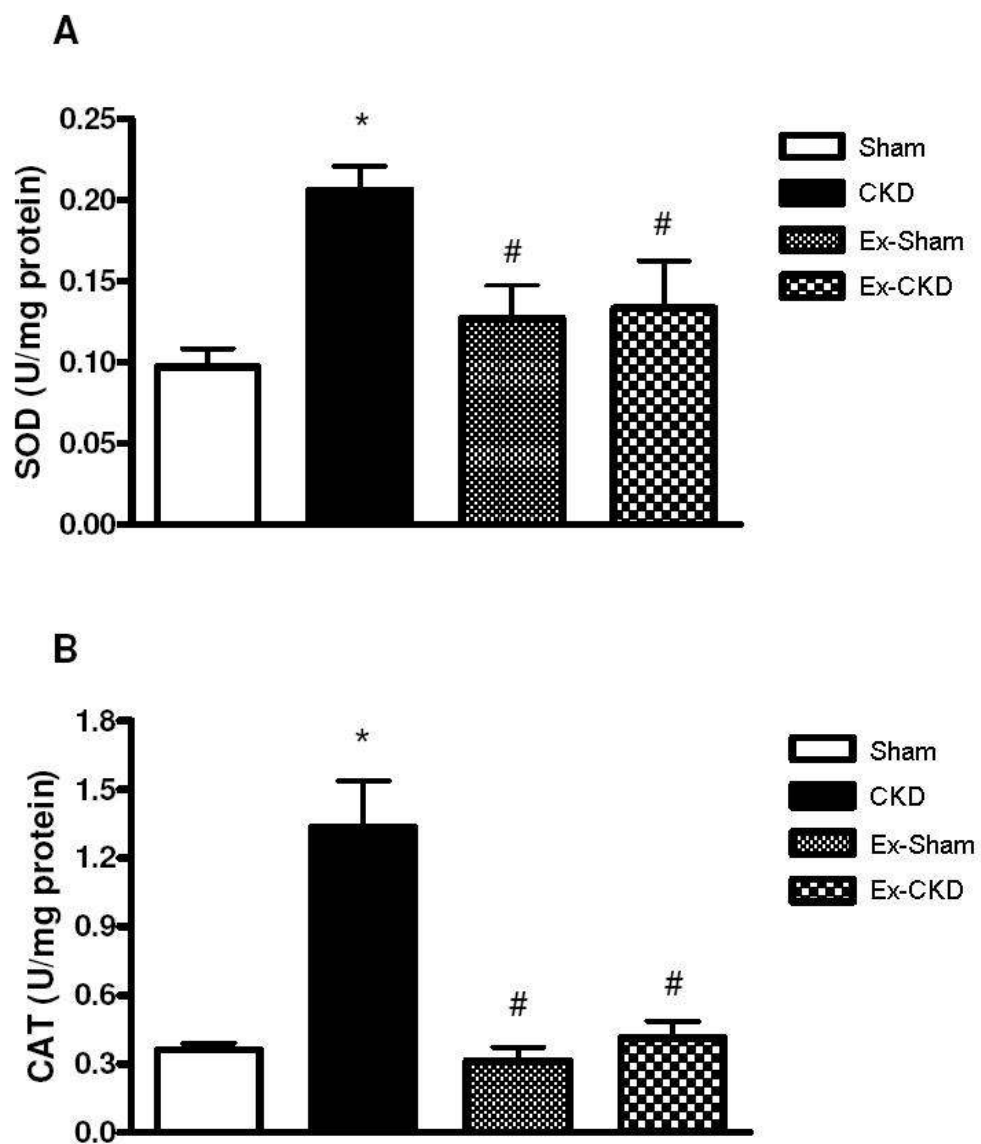


Figure 3

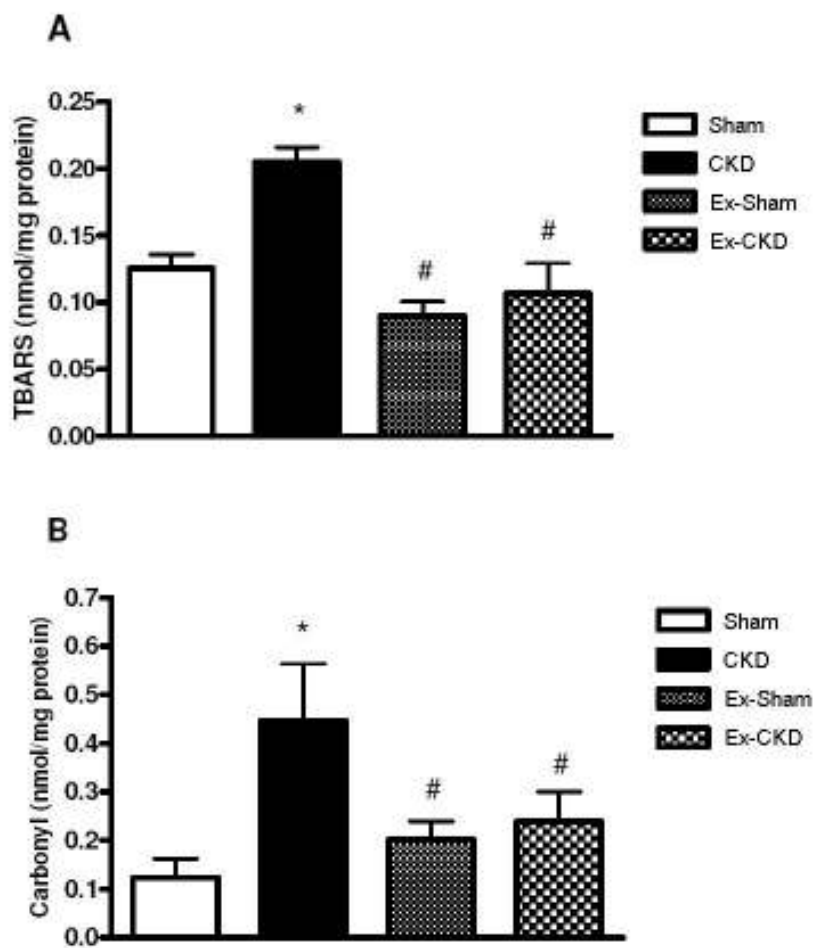
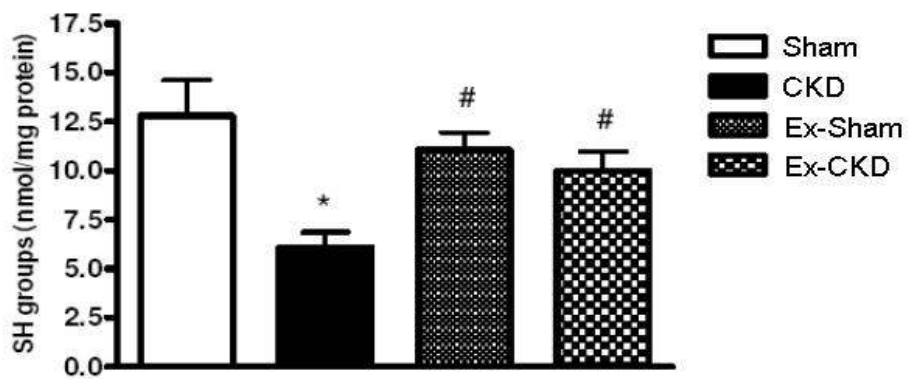


Figure 4



CAPÍTULO III
DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

O objetivo dessa dissertação foi pautado nos possíveis efeitos preventivos do exercício físico na redução dos parâmetros de estresse oxidativo induzidos pela insuficiência renal crônica. Para tanto, partimos das seguintes evidências científicas:

- a) A insuficiência renal crônica eleva os níveis sistêmicos de creatinina e uréia.
- b) Após a insuficiência renal crônica ocorre um aumento nos parâmetros de estresse oxidativo.
- c) O exercício físico preventivo estimula o sistema de defesa antioxidante reduzindo os danos oxidativos gerados pela doença renal.

De acordo com Mandal (2007), a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) está diretamente envolvida na fisiopatogênese da doença renal crônica. A lesão renal promove uma resposta isquêmica liberando Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio (ERDOGAN, 2002). Essas ERO também podem ser liberadas devido à migração, acúmulo e ativação de células polimorfonucleares. Essa cascata de eventos traz em consequência danos oxidativos a biomoléculas como lipoperoxidação da membrana celular, oxidação de proteínas, proteólises e fragmentação de DNA (HALLIWELLI & GUTTERIDGE, 2007). Adicionalmente, ocorre um desarranjo na integridade estrutural e na função celular do rim, induzindo alterações na capacidade de transporte, produção de energia e balanço hídrico (BERGAMINI, 2006).

Nos últimos anos é crescente o interesse em verificar os efeitos do exercício aeróbico sobre a doença crônica. O exercício pode diminuir a morbidade e mortalidade por reduzir inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial

(MOINUDDIN, 2008). Pacientes com doenças crônicas que realizam treinamentos de resistência e exercícios aeróbicos apresentam uma melhora significativa na função renal e outros fatores associados à doença (MOINUDDIN & LEEHEY, 2008). Adicionalmente, Pechter (2003) sugere que o exercício aeróbico tem uma influência positiva na capacidade física, hipertensão, função ventricular esquerda, metabolismo de glicose e lipídios e danos oxidativos.

Todavia, os agentes farmacológicos e procedimentos de hemodiálise ainda predominam como os meios terapêuticos para o tratamento da IRC, contudo, outras terapêuticas podem contribuir para amenizar a gravidade e progressão da doença. Um dos recursos terapêuticos atualmente muito investigado em diversas doenças é o exercício físico. Os efeitos benéficos do exercício físico na IRC ainda apresentam resultados contraditórios e a literatura é inespecífica quanto aos efeitos preventivos do exercício sobre marcadores de estresse oxidativo e sua relação na fisiopatogênese da IRC.

No presente estudo, nossos resultados demonstraram que os animais com IRC apresentam níveis elevados de creatinina e uréia e esses valores não foram alterados com o exercício físico preventivo. O aumento observado se deve à função renal alterada provocado pela redução da massa renal (FUJIHARA et al., 2007). Possivelmente, esses valores permaneceram altos no grupo que realizou programa de treinamento devido à lesão renal irreversível provocado pela nefrectomia, portanto não sendo afetada pelo exercício. Adicionalmente, o tempo entre o final do programa e o sacrifício dos animais é suficiente para reduzir a presença de subprodutos formados durante o catabolismo protéico e da creatina induzidos pelo exercício.

Vários estudos têm mostrado um aumento na produção de ERO na IRC (GOEDDEKE-MERICKEL, 2005) e que o exercício físico regular pode melhorar o sistema de defesa antioxidante e a resistência do tecido ao dano oxidativo (MARI-CARMEN et al., 2007; RADAK et al., 2007).

Nossos achados mostram um aumento na produção de anion superóxido no grupo induzido a IRC acompanhado por uma elevação na atividade da SOD e CAT. Contudo, os animais expostos ao exercício físico preventivo e com IRC não aumentaram a esses valores.

Como o exercício físico preventivo não alterou o sistema de defesa antioxidante, é possível que a redução da produção de anion superóxido possa ser relacionada com a alta regulação de proteínas desacopladoras mitocondriais ou simplesmente com a aceleração no transporte de elétrons, aumentando a oferta de ADP e diminuindo a produção de ROS (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Isso pode explicar a baixa atividade da SOD e CAT nos animais treinados previamente.

Marcadores de danos oxidativos em lipídeos e proteínas também tiveram um aumento significativo no grupo com IRC, sugerindo que o estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese da IRC.

O acúmulo de produtos da lipoperoxidação associado com alta produção de grupos carbonis causa excessiva oxidação em proteínas, lipídeos e carboidratos, levando a modificações irreversíveis em proteínas induzindo a complicações ao longo do tempo associado com a IRC (MIYATA et al., 1998). Além disso, os efeitos positivos do treinamento físico preventivo sobre o dano oxidativo em lipídeos e proteínas observados estão possivelmente associados com a diminuição de oxidantes nos animais treinados. Embora o exercício não tenha aumentado a

atividade antioxidante enzimática, seus efeitos sobre a produção de anion superóxido foi decisiva na redução dos danos oxidativos.

Himmelfarb et al. (2002) sugerem que níveis elevados de tióis oxidados ou a depleção de tióis reduzidos assim como a formação de grupos carbonil estão diretamente relacionados à doença renal crônica. A redução de tióis totais observada em nosso estudo pode sinergicamente alterar o estado redox e acelerar a progressão da doença. Entretanto, o exercício físico pode diminuir essa resposta por reduzir a produção de oxidantes.

Por fim, os resultados no presente estudo reforçam o envolvimento das ERO na IRC e que o treinamento físico realizado preventivamente é capaz de melhorar os parâmetros de estresse oxidativo da IRC mesmo não alterando os sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos.

CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES

Embora evidências experimentais significativas demonstrem efeitos terapêuticos do exercício físico em modelos animais e humanos, poucos estudos mostram efeito clínico protetor do treinamento físico regular. Assim, esse estudo é o primeiro a mostrar que a realização de exercício físico regular é capaz de melhorar parâmetros de danos oxidativo sem alterar função renal e atividade antioxidante enzimática induzidos pela Insuficiência Renal Crônica.

Através desse estudo espera-se contribuir para melhor compreender e elucidar os mecanismos bioquímicos envolvidos nos processos oxidativos da doença renal, entretanto, outras investigações devem ser conduzidas utilizando outros modelos animais e em humanos e outros marcadores de estresse oxidativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL R. On the nature of proteinuria with acute renal injury in patients with chronic kidney disease. **Am J Physiol Renal Physiol** 288. 2005.

ANNUC M; ZILMER M; LIND L. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. **J Am Soc Nephrol** 12: 2747-2752. 2001.

BARREIROS A; DAVID JM. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Rev. Quim Nova** 29: 113-123. 2006.

BRENNER BM; RECTOR FC. **The Kidney**. (WB Saunders Company). Philadelphia, 1997.

CANAUD B; CRISTOL JP; MORENA M; LERAY-MORAGUES H; BOSC JY; VAUSSENAT F. Imbalance of oxidants and antioxidants in hemodialysis patients. **Blood Purif** 17: 99-106. 1999.

CEBALLOS-PICOT I, WITKO-SARSAT V, MERAD-BOUDIA M. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. **Free Radical Biology and Medicine** 21: 845-853. 1996.

CLYNE N, HEIWE S; TOOBÄCK A; BORG K. Effects of regular resistance training on muscle histopathology and morphometry in elderly patients with chronic kidney disease. **Am J Phys Med Rehabil** 84: 865-874. 2005.

CROWE AV; MCALDLE A; MCALDLE F. Markers of oxidative stress in the skeletal muscle of patients on haemodialysis. **Nephrol Dial Transplant** 22: 1177-1183. 2007.

DALLE-DONNE I; GIUSTARINI D; COLOMBO R; ROSSI R; MILZANI A. Protein carbonylation in human diseases. **TRENDS in Molecular Medicine** 2003.

DAVIES, K J A; DHRINGARPURE, R. Preferential degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome may be inhibited in aging and inflammatory neuromuscular diseases. **Neurology** 66: 93-96 2006.

DIAZ M, FREI B, VITA JA, KEANEY JF. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. **N Engl J Med** 337: 408–416. 1997

FELIERS D; LEE D; GHOSH-CHOUDHURY G; BOMSZTYK K; KASINATH BS. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K contributes to angiotensin II stimulation of vascular endothelial growth factor mRNA translation. **Am J Physiol Renal Physiol** 293: 607–615. 2007.

FLOHE, L. Glutathione peroxidase brought into focus. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. (Academic Press). New York. 1982.

FORD ES. Does exercise reduce inflammation ? Physical activity and C-reactive protein among U.S adults. **Epidemiology** 13: 561-568. 2002.

GOEDDEKE-MERICKE CM. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Rev Adv Chronic Kidney Disease** 12: 326-334. 2005.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC. **Free Radical in Biology Medicine**. (University Press). Oxford NY .2007.

HARRISON TR; BRAUNWALD E. **Medicina interna**. (McGraw-Hill). Rio de Janeiro. 2002

HASDAN G, BENCHETRIT S, RASHID G, GREEN J, BERNHEIM J, RATHAUS M. Endothelial dysfunction and hypertension in 5/6 nephrectomized rats are mediated by vascular superoxide. **Kidney Int** 61: 586–590. 2002.

HEIWE S; CLYNE N; TOOBÄCK A; BORG K. Effects of regular resistance training on muscle histopathology and morphometry in elderly patients with chronic kidney disease. **Am J Phys Med Rehabil** 84: 865-874. 2005.

HERLIHY BL; MAEBIUS NK; LIBERTI EA. **Anatomia e fisiologia do corpo humano saudável e enfermo.** (Manole). São Paulo. 2002.

HIMMELFARB J, STENVINKEL P, IKIZLER A. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. **Kidney Int** 2002;62:1524–38.

ILES KE; Forman HJ. Macrophage Signaling and Respiratory Burst. **Immunol Res** 26: 95-106. 2002.

JI LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol** 87: 465-470. 1999.

JOHANSEN KL. Exercise and Chronic Kidney Disease Current Recommendations. **Sports Med** 35: 485-499. 2005.

JUNIOR JER. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia** 26: 1-3. 2004.

KALANTAR-ZADEH K, IKIZLER TA, BLOCK G. Malnutrition inflammation complex syndrome in dialysis patients: Causes and consequences. **Am J Kidney Dis** 42: 864-881. 2003.

KÖNIG D; BERG A. Exercise and oxidative stress: Is there a need for additional antioxidants. **Österreichisches J. Für Sportmedizin** 3: 6-15. 2002.

LIM PS; CHENG YM; WEI YH. Increase in oxidative stress damage to lipids and proteins in skeletal muscle of uremic patients. **Free Radic Res** 36: 295-301. 2002.

MACDONALD JH, MARCORA SM, JIBANI M. Intradialytic exercise as anabolic therapy in haemodialysis patients—A pilot study. **Clin Physiol Funct Imaging** 25: 113-118. 2005.

MATSUBARA N; HIRAMATSU M; EDAMATSU R. Possible involvement of free radical scavenging properties in the action of tumor necrosis factor-alpha. **Free Radic Biol Med** 22: 679-87. 1997.

MATSUO M; KANEKO T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák, Z. **Free Radicals in Exercise and Aging Champaign: Human Kinetics**. 2001.

MIYATA T, UEDA Y, IZUHARA Y. Accumulation of carbonyls accelerates the formation of pentosidine, an advanced glycation end product: Carbonyl stress in uremia. **J Am Soc Nephrol** 9: 2349-2356. 1998.

MOINUDDIN I; LEEHEY DJ. A comparison of aerobic exercise and resistance training in patients with and without chronic kidney disease. **Adv Chronic Kidney Dis** 15: 83-96. 2008.

PAWLAK K, MYSLIWIEC M, PAWLAK D. Oxidative stress, phosphate and creatinine levels are independently associated with vascular endothelial growth factor levels in patients with chronic renal failure. **Cytokine** 43: 98-101. 2008.

PINHO, R.; ANDRADES, M E; OLIVEIRA, M R; PIROLA, A C; ZAGO, M S; SILVEIRA, PC., DAL-PIZZOL, F; MOREIRA, J C. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell. Biol. Int** 30: 848-53. 2006.

PRAXEDES et al. **Fisiologia Médica**. (SAVIER) São Paulo. 2006.

RADAK Z, KUMAGAI S, TAYLOR AW, et al. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. **Appl Physiol Nutr Metab** 32: 942-6. 2007.

ROBBINS SL; COTRAN RS; KUMAR V; ABBAS AK; FAUSTO N. In: **Patologia: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro. 2005.

RUTKOWSKI P; MALGORZEWICZ S; SLOMINSKA E. Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress. **Journal of Renal Nutrition** 16: 190-193. 2006.

SCOTT NA; JENNINGS PE; BROWN J; BELCH JJ; GLICLAZIDE. A general free radical scavenger. **Eur J Pharmacol** 208: 175-7. 1991.

SHAH SV; BALIGA R; RAJAPURKAR M; FONSECA VA. Oxidants in Chronic Kidney Disease. **J Am Soc Nephrol** 18: 16–28. 2007.

STORER TW, CASABURI R, SAWELSON S. Endurance exercise training during haemodialysis improves strength, power, fatigability and physical performance in maintenance haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant** 20: 1429-1437. 2005.

STUGART P; WEISS J. Exercise, rehabilitation, and the dialysis patient : One unit's positive experiences. **Dialysis & transplantation** 28: 134-157. 1999.

TEPEL M, GIETM VD, STATZ M. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. **Circulation** 107: 992-995. 2003.

URSO ML; CLARKSON PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology** 189: 41-54. 2003.

VANHOLDER R, MASSY Z, ARGILES A, SPASOVSKI G, VERBEKE F, LAMEIRE N. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. **Nephrol Dial Transplant** 20: 1048–1056. 2005.

VAZIRI ND. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 13: 93-99. 2004.

ZATZ, R. Série Fisiopatologia Clínica. In: **Fisiologia Renal**. (Editora Atheneu). São Paulo, pp. 21 – 29, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)