



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO INIBIDOR DO COTRANSPORTADOR
DE SÓDIO-GLICOSE-2 SOBRE O ESTADO REDOX, INFLAMATÓRIO E
METABÓLICO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE ANIMAIS EXPOSTOS À DOENÇA
RENAL DO DIABETES EXPERIMENTAL**

DOUTORANDO: André Domingos Lass

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho

Curitiba, Outubro de 2024



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO INIBIDOR DO COTRANSPORTADOR
DE SÓDIO-GLICOSE-2 SOBRE O ESTADO REDOX, INFLAMATÓRIO E
METABÓLICO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE ANIMAIS EXPOSTOS À DOENÇA
RENAL DO DIABETES EXPERIMENTAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde como
requisito à obtenção do Título de Doutor em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho

Curitiba, Outubro de 2024

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

L346e
2024

Lass, André Domingos
Efeitos do exercício físico e do inibidor do cotransportador de sódio-glicose-2 sobre o estado redox, inflamatório e metabólico muscular esquelético de animais expostos à doença renal do diabetes experimental / André Domingos Lass ; orientador: Ricardo Aurino de Pinho. – 2024.
117 f. ; il. : 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2024
Bibliografia: f. 79-112

1. Diabetes mellitus. 2. Inibidores do transportador 2 de sódio-glicose.
3. Estresse oxidativo. 4. Nefrologias. 5. Obesidade. I. Pinho, Ricardo Aurino.
II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD. 20. ed. – 711.4



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 08 dias do mês de outubro de 2024 às 14:00, realizou-se a sessão aberta de Defesa de Tese "EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO INIBIDOR DO COTRANSPORTADOR DE SÓDIO-GLICOSE-2 NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE ANIMAIS EXPOSTOS À DOENÇA RENAL DO DIABETES EXPERIMENTAL" apresentado André Domingos Lass para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Pesquisa Médica Translacional.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho - Presidente	
Prof. Dr. Adriano Akira Ferreira Hino - PUCPR	
Profa. Dra. Patricia Maria Stuelp Campelo - PUCPR	
Profa. Dra. Renata Labronici Bertin - UFPR	
Prof. Dr. Adriano Eduardo Lima da Silva - UTFPR	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho
Prof. Dr. Adriano Akira Ferreira Hino
Profa. Dra. Patricia Maria Stuelp Campelo
Profa. Dra. Renata Labronici Bertin
Prof. Dr. Adriano Eduardo Lima da Silva

Conceito: APROVADO
Conceito: APROVADO
Conceito: APROVADO
Conceito: APROVADO
Conceito: APROVADO

Parecer Final: APROVADO.

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

FOLHA INFORMATIVA

A presente tese foi elaborada seguindo a normatização de Vancouver.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioquímica do Exercício em Saúde (BioEx), do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR, em colaboração com o Prof. Dr. Luis Cláudio Fernandes (e sua equipe) do Laboratório de Metabolismo Celular; Profa. Dra. Katya Naliwaiko (e sua equipe) do Laboratório de Plasticidade Morfofuncional, ambos da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Campus Curitiba; e Prof. Dr. Paulo Cesar Lopes Silveira (e sua equipe) do Grupo de Pesquisa em Proteção e Reparo Tecidual, da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). O presente trabalho foi parcialmente financiado com bolsa de doutorado da CAPES e bolsas de iniciação científica da PUCPR e CNPq, além de financiamento da Fundação Araucária.

Declaro não haver conflito de interesses na realização deste trabalho.

Dedico este trabalho aos meus pais, filhos, irmã e sobrinha pelo apoio, compreensão e amor incondicionais a mim dedicados durante toda a minha vida. E a Deus pela Sua presença na minha existência, me guiando, protegendo, iluminando e mostrando a importância de tentar ser o meu melhor todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Ao meu colega e companheiro de pesquisa Dr. Paulo André Bispo Machado Júnior, pelas tantas horas divididas principalmente em laboratório e biotério em todas as etapas desse estudo. Sem a sua participação e árduo trabalho, nada disso teria sido possível.

À Profa. Dra. Maria Cristina Kogut, maior incentivadora da minha volta aos estudos, que considero exemplo vivo de dedicação e amor à profissão de Educadora Física, representando-a com integridade e dignidade absolutas.

Ao Prof. Dr. Oslei de Matos a quem tenho a honra de considerar amigo e mentor, responsável por abrir as portas da UTFPR ainda em 2017, onde realizei meu mestrado. Sua sabedoria, determinação e inesgotável ânsia em aprender e ensinar são exemplos nos quais, desde 1996, me espelho.

Ao Prof. Dr. Luis Cláudio Fernandes e Profa. Dra. Katya Naliwaiko, da UFPR, e Prof. Dr. Paulo Cesar Lopes Silveira, da UNESC, pela colaboração e de suas equipes na condução de parte das análises sem as quais este estudo não teria sido executado.

Aos Prof. Drs. Matheus Felipe Zazula e Fernando Rodrigo Doline, Profas. Dras. Stephanie Rubianne Silva Carvalhal e Thabata Caroline Oliveira Santos, da UFPR, por toda ajuda, divisão de conhecimento e auxílio em laboratório, tendo contribuído diretamente para o êxito deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica do Exercício em Saúde (BioEx) do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR, em particular à colega Bióloga Ms. Bruna Isadora Pilger, pela sua participação e auxílio nas coletas e condução dos experimentos e análises do presente estudo.

À equipe técnica do Laboratório Experimental Multiuso (LEM) do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR, representada por Irenice Cairo e Sheron Cogo, que sempre prontamente compartilharam seus conhecimentos técnicos e prestaram toda ajuda necessária. Os mesmos agradecimentos se estendem às demais equipes administrativa, de limpeza e manutenção do programa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR pelos ensinamentos e pela divisão de conhecimento ao longo desses quatro anos. À Escola de Medicina e Ciências da Vida da PUCPR, CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelas bolsas concedidas no período de 2020-2024.

À amiga e Professora Renata Maria Santos Ferreira, que com sua insaciável busca pelo conhecimento e sua disseminação me inspira desde 1991, tendo sido responsável pela revisão ortográfica desta tese.

Com a mesma e absoluta importância, aos meus alunos/as e amigos/as, que no decorrer deste doutoramento me apoiaram de diversas formas, sendo pacientes e compreensivos para que o bom cumprimento do meu papel enquanto pesquisador fosse desempenhado da melhor forma.

Finalmente, agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho, meu orientador, por ter-me aceitado como aluno ao acreditar na minha competência, entendendo as minhas limitações e exigindo de mim as tarefas que hoje me tornam seu par. Agradeço pelos ensinamentos, reflexões e cobranças realizadas, essenciais para a minha formação.

Tell your mountain about your God.

Mark, 11:22-24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via da sinalização da insulina em pessoas diabéticas tipos 1 e 2.	25
Figura 2. Mecanismo hemodinâmico da doença renal do diabetes.	28
Figura 3. Benefícios da farmacoterapia e do exercício na obesidade e metabolismo.	31
Figura 4. Efeitos protetivos do exercício no combate à doença renal do diabetes.	33
Figura 5. Mecanismo de captação da glicose na prática do exercício físico.	35
Figura 6. Mecanismo de ação do iSGLT2.	37
Figura 7. Desenho do estudo experimental.	41
Figura 8. Dados de massa corporal de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.	53
Figura 9. Valores de glicose plasmática em animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental – grupos Sham e DRDe	55
Figura 10. Valores do teste de tolerância a glicose (GTT) em animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.	56
Figura 11. Valores de glicose urinária (a) e albumina urinária (b) em animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.	57
Figura 12. Valores de glicose plasmática em animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental – grupos experimentais	60
Figura 13. Produção de ERO no músculo quadríceps de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.	61
Figura 14. Atividade da catalase (a e b) e glutathiona peroxidase (c e d) no músculo quadríceps de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.	62
Figura 15. Níveis de malondialdeído (a e b) e carbonilação de proteínas (c e d) no músculo quadríceps de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental..	63

Figura 16. Níveis de TNF- α (a, b), IL-6 (c, d) e IL-10 (e, f) no músculo gastrocnêmio de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental..... 64

Figura 17. Níveis de PI3K (a, e), Akt-p (b, f) e AMPK (c, g) no músculo sóleo de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas.....	42
Tabela 2. Teste de velocidade máxima.....	44
Tabela 3. Protocolo de exercício físico.	44
Tabela 4. Lista de anticorpos utilizados como controles endógenos.....	50
Tabela 5. Massa corporal mensurada na 1 ^a , 17 ^a e 25 ^a semanas do estudo.....	53
Tabela 6. Consumo calórico diário médio de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental – grupos Sham e DRDe.	54
Tabela 7. Efeitos do exercício e iSGLT2 sobre a massa corporal mensurada na 1 ^a , 17 ^a e 25 ^a semanas do estudo.	58
Tabela 8. Consumo calórico diário médio de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental – grupos experimentais.	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Akt	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato, do inglês, <i>5'-adenosine monophosphate activated protein kinase</i>
ANOVA	Análise de variância simples
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética no uso animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DHL	Dieta hiperlipídica
DNPH	2-4-dinitrofenil-hidrazina
DP	Dieta padrão
DRC	Doença renal crônica
DRD	Doença renal do diabetes
DRDe	Doença renal do diabetes experimental
DM	Diabetes mellitus
T1DM	Diabetes mellitus tipo 1
T2DM	Diabetes mellitus tipo 2
Ex	Exercício físico
EMP	Empagliflozina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GLUT	Transportador de glicose, do inglês, <i>glucose cotransporter</i>

GLUT4	Transportador de glicose 4, do inglês, <i>glucose cotransporter 4</i>
GPx	Glutathione peroxidase
GTT	Teste de tolerância a glicose, do inglês, <i>glucose tolerance test</i>
HIIT	Treino intervalado de alta intensidade, do inglês, <i>high intensity interval training</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance, do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de massa corporal
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina, do inglês, <i>insulin receptor substrate 1</i>
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NADP(H)	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
PI3K-Akt	Fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B, do inglês, <i>phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B</i>
RI	Resistência à insulina
RIPA	Tampão de radioimunoprecipitação, do inglês, <i>radioimmunoprecipitation assay</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>

SGLT	Cotransportador de sódio-glicose, do inglês <i>sodium-glucose cotransporter</i>
SGLT1	Cotransportador de sódio-glicose subtipo 1, do inglês, <i>sodium-glucose cotransporter 1</i>
SGLT2	Cotransportador de sódio-glicose subtipo 2, do inglês, <i>sodium-glucose cotransporter 2</i>
iSGLT2	Inibidor do cotransportador de sódio-glicose-2, do inglês <i>sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor</i>
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina, do inglês <i>streptozotocin</i>
TBST	Salina tris-tamponada com tween 20, do inglês, <i>tris-buffered saline with tween 20</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês, <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TV _{max}	Teste de velocidade máxima

RESUMO

Introdução: A relevância das respostas redox, inflamatórias e metabólicas do músculo esquelético na gênese e progressão da doença renal do diabetes (DRD) tem sido demonstrada em estudos recentes, nos quais o estresse oxidativo se apresenta como um excelente regulador desse mecanismo. O combate a doenças crônicas com inflamação de baixo grau, como a DRD, é realizado por abordagens não farmacológicas, tendo a dieta e o exercício físico leve e moderado como exemplos, e farmacológicas, como pelo emprego dos inibidores do cotransportador sódio-glicose-2 (iSGLT2), sendo que os efeitos dessas duas terapias, combinadas ou não, ainda não foram completamente elucidados na literatura.

Objetivo: Avaliar os efeitos do exercício associado ao iSGLT2 na regulação do sistema redox, inflamatória e metabólica muscular em animais expostos à DRD experimental (DRDe). **Materiais e métodos:** Camundongos C57BL/6J foram randomicamente divididos em 5 grupos e expostos à DRDe através da associação de dieta hiperlipídica (DHL) e dose única de estreptozotocina (STZ, 40mg/kg). Após 15 semanas, os animais receberam iSGLT2 (empagliflozina, 35mg/kg) ou veículo por gavagem, associados ou não a um programa de exercícios (Ex) de intensidade intermediária. Parâmetros clínicos (variação de peso, consumo calórico e glicemia plasmática) e funcionais (glicosúria e albuminúria) foram avaliados ao longo do experimento. Após 25 semanas de estudo, os animais foram expostos à eutanásia para obtenção de amostras musculares, bem como para a avaliação dos parâmetros histológicos e moleculares. Valores de $p < 0,05$ denotaram significância estatística. **Resultados:** O aumento da obesidade e o quadro do diabetes promoveram elevação significativa no peso corporal, na glicemia e nos níveis de glicosúria e albuminúria, porém nenhuma alteração foi observada nos parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios analisados. O tratamento com iSGLT2 reduziu os patamares de glicemia, da glicosúria e albuminúria, além de reduzir os níveis de IL-10 e o conteúdo PI3K no tecido muscular. O programa de exercício físico reduziu a glicemia, a glicosúria e a albuminúria, sem, entretanto, proporcionar efeito significativo nos níveis inflamatórios, redox e metabólicos. O uso associado do iSGLT2 e do exercício físico, por sua vez, reduziu os medidores inflamatórios no tecido muscular. Os resultados deste estudo demonstram que tanto o tratamento com o iSGLT2 quanto com o exercício físico, individualmente e em combinação, oferecem benefícios distintos e complementares para camundongos diabéticos obesos expostos a uma dieta hiperlipídica.

Palavras-chave: estresse oxidativo; iSGLT2; obesidade; diabetes mellitus; doença renal do diabetes.

ABSTRACT

Introduction: The relevance of redox, inflammatory, and metabolic responses of skeletal muscle in the genesis and progression of diabetic kidney disease (DKD) has been demonstrated in recent studies, where oxidative stress emerges as a key regulator of this mechanism. The management of chronic diseases with low-grade inflammation, such as DKD, involves both non-pharmacological approaches, like diet and moderate exercise, and pharmacological interventions, such as sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2i) inhibitors. However, the combined effects of these two therapies on skeletal muscle remain incompletely understood. Objective: To evaluate the effects of exercise combined with SGLT2 inhibition on the regulation of the muscular redox, inflammatory, and metabolic system in animals with experimental diabetic kidney disease (eDKD). **Materials and Methods:** C57BL/6J mice were randomly divided into 5 groups and exposed to eDKD through a combination of a hyperlipidaemic diet (HFD) and a single dose of streptozotocin (STZ, 40mg/kg). After 15 weeks, animals received SGLT2 inhibitors (empagliflozin, 35mg/kg) or vehicle by gavage, with or without an intermediate-intensity exercise program (Ex). Clinical parameters (weight variation, caloric intake, and plasma glucose) and functional parameters (glycosuria and albuminuria) were assessed throughout the experiment. After 25 weeks, animals were euthanized for muscle sample collection and histological and molecular analyses. Statistical significance was set at $p < 0.05$. **Results:** Increased obesity and diabetes led to significant elevations in body weight, glycemia, glycosuria, and albuminuria, but no alterations were observed in oxidative stress and inflammatory markers. SGLT2 treatment reduced glycemia, glycosuria, albuminuria, and muscle IL-10 and PI3K levels. Exercise reduced glycemia, glycosuria, and albuminuria but had no significant effect on inflammatory, redox, or metabolic markers. The combination of SGLT2 and exercise reduced inflammatory markers in muscle tissue. **Conclusion:** Both SGLT2 inhibition and exercise, individually and in combination, offer distinct and complementary benefits for obese diabetic mice with eDKD.

Keywords: oxidative stress; SGLT2i; obesity; diabetes mellitus; diabetic kidney disease.

RESUMO POPULAR

A doença renal do diabetes é uma condição que acomete especificamente pessoas portadoras do diabetes mellitus, podendo causar a falência do rim e, eventualmente, o óbito. A prática de exercícios físicos e o uso de medicamentos, separadamente, têm eficiência comprovada no combate à doença. Porém, a eficiência da aplicação associada dessas duas terapias ainda não está estabelecida. Esse estudo buscou analisar, em camundongos expostos à doença renal do diabetes experimental, o efeito do uso combinado do exercício físico moderado ao medicamento como forma de tratamento. Os resultados aqui apresentados demonstram a eficiência da ação sinérgica do exercício na sua associação ao medicamento através da redução do mecanismo inflamatório.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 JUSTIFICATIVA	23
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1 OBESIDADE	24
3.2 DIABETES MELLITUS	26
3.3 DOENÇA RENAL DO DIABETES	27
3.3.1 Inflamação na Doença Renal do Diabetes	28
3.3.2 Mecanismo Redox na Doença Renal do Diabetes	29
3.4 EXERCÍCIO FÍSICO	30
3.4.1 Exercício Físico e a Doença Renal do Diabetes	32
3.4.2 Exercício Físico, Regulação Redox e Resposta Inflamatória.....	34
3.5 COTRANSPORTADORES DE SÓDIO-GLICOSE-2	36
3.5.1 Inibidores dos cotransportadores de sódio-glicose-2.....	36
4 OBJETIVOS	39
4.1 GERAL.....	39
4.2 ESPECÍFICOS	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1 PROCEDIMENTOS BIOÉTICOS.....	40
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	40
5.3 INDUÇÃO DA DOENÇA RENAL DO DIABETES EXPERIMENTAL	41
5.4 TRATAMENTOS	43
5.5 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO	44
5.5.1 Massa corporal e consumo alimentar	44

5.5.2 Indicadores Renais	45
5.5.3 Glicemia.....	45
5.5.4 Teste de tolerância a glicose (GTT).....	46
5.6 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS	46
5.7 ANÁLISES DOS TECIDOS.....	47
5.7.1 Análises moleculares	47
5.7.1.1 Produção de ERO	47
5.7.1.2 Dano oxidativo em lipídios	48
5.7.1.3 Dano oxidativo em proteínas.....	48
5.7.1.4 Marcadores inflamatórios.....	49
5.7.1.5 Sinalização metabólica	49
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
6 RESULTADOS	52
6.1 EFEITOS DO MODELO DE DRDE SOBRE INDICADORES CLÍNICOS E FUNÇÃO RENAL.....	52
6.1.1 Massa corporal.....	52
6.1.2 Consumo calórico médio diário.....	54
6.1.3 Glicemia.....	55
6.1.4 Teste de tolerância à glicose (GTT).....	56
6.1.5 Glicosúria e albuminúria	56
6.2 EFEITOS ISOLADOS E SINÉRGICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO MEDICAMENTO SOBRE A MUSCULATURA ESQUELÉTICA.....	57
6.2.1 Massa corporal.....	57
6.2.2 Consumo calórico diário médio.....	58
6.2.3 Glicemia.....	59

6.2.4 Produção de espécies reativas de oxigênio	60
6.2.5 Atividade de enzimas antioxidantes.....	61
6.2.6 Danos oxidativos	62
6.2.7 Parâmetros inflamatórios	63
6.2.8 Parâmetros metabólicos.....	65
7 DISCUSSÃO	67
8 CONCLUSÃO.....	78
8.1 LIMITAÇÕES.....	79
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
10 REFERÊNCIAS	81
11 MATERIAL SUPLEMENTAR.....	115
12 CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP	117

1 INTRODUÇÃO

Os elementos atualmente favoráveis ao sedentarismo e à urbanização dos espaços, aliados a uma maior expectativa de vida, são um paradoxo na busca da longevidade com qualidade de sobrevivência para o ser humano. O mais recente levantamento global estima que, em 2025, pelo menos 2,7 bilhões de pessoas ao redor do mundo estarão com sobrepeso, além de 1 bilhão de obesas e outras 177 milhões extremamente obesas [1-4]. A obesidade é uma síndrome metabólica caracterizada por um estado de inflamação crônica sistêmica e de baixo grau, que contribui para o desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica, entre 13 e 22 tipos de câncer e que representa um fator de risco sete vezes maior para o diabetes mellitus (DM) tipo 2 (T2DM), de cuja doença aproximadamente 90% dos adultos são obesos [5-8]. A obesidade eleva também o risco da doença renal crônica (DRC) e da doença renal do diabetes (DRD), também conhecida como nefropatia diabética [9, 10]. A DRD é geralmente assintomática, caracterizada pela hipertrofia, esclerose e fibrose glomerular em um quadro patológico resultante da exposição prolongada a patamares elevados de glicose no sangue, levando a alterações metabólicas e hemodinâmicas. A progressão da DRD se manifesta através da albuminúria lentamente progressiva, acompanhada do agravamento da insuficiência renal e hipertensão, sendo que tais complicações comprometem também de forma gradual a capacidade de filtração dos rins, levando a um declínio irreversível da sua função [9, 11, 12].

O manejo eficaz da obesidade e do T2DM é fundamental para prevenir e retardar o início da DRD. Dentre as terapias farmacológicas no enfrentamento da doença, os inibidores dos cotransportadores de sódio-glicose-2 (iSGLT2) são uma classe de medicamentos que impede a reabsorção de glicose pelos rins, tendo sido utilizada com êxito na última década [13, 14]. As substâncias ativas utilizadas e seus respectivos nomes comerciais são a canagliflozina (Invokana[®]), a dapagliflozina (Forxiga[®]), a empagliflozina (Jardiance[®]) e a

ertugliflozina (Steglatro®). Além disso, os iSGLT2 vêm apresentando efetividade terapêutica multifacetada por, além da melhora renal evidenciada através da diminuição dos níveis de albuminúria e desaceleração da DRC, proporcionar progressos também no controle metabólico e efeitos cardioprotetivos [15-18].

Adicionalmente, terapias não-farmacológicas como o exercício físico são uma estratégia auxiliar aos tratamentos convencionais com comprovada eficácia [19-22], exemplificada pela publicação, liderada por um grupo multidisciplinar de experts, da primeira diretriz global sobre a sua utilização como instrumento de combate a DRC [23]. Os vários efeitos mediados pelo exercício físico em geral refletem positivamente na ação de diferentes órgãos e sistemas, em particular o muscular esquelético, que contribui para o controle e diminuição da obesidade e do T2DM, através da melhora da sensibilidade à insulina, repercutindo na captação de glicose e consequente redução dos seus níveis séricos e da gordura corporal, tanto em seres humanos quanto em animais. Tais mecanismos impactam diretamente na evolução da função renal e redução do risco de complicações renais do T2DM [24-30].

Apesar da reconhecida utilização do exercício como parte do tratamento da doença, sua associação e possíveis efeitos benéficos no papel como agente sinérgico com os iSGLT2 na resposta redox, inflamatória e metabólica muscular da DRD não foram ainda testados, o que pode trazer um considerável avanço no combate à doença.

2 JUSTIFICATIVA

A maneira com que o músculo esquelético reage à combinação do exercício de cunho leve e moderado com o inibidor do cotransportador de sódio-glicose-2 no combate à doença renal do diabetes não está estabelecida na literatura, gerando assim uma lacuna no conhecimento científico e clínico. A compreensão das adaptações no ambiente molecular causadas pela associação dessas terapias é essencial para a desaceleração ou até mesmo reversão de alguns dos efeitos da doença, visando assim proporcionar melhor qualidade de vida à pessoa por ela acometida. Na busca de compreenderem-se os mecanismos de resposta ao tratamento proposto nesse experimento pré-clínico, espera-se contribuir para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas clínicas nefroprotetoras que possam servir de base para políticas de saúde pública.

3 REVISÃO DE LITERATURA

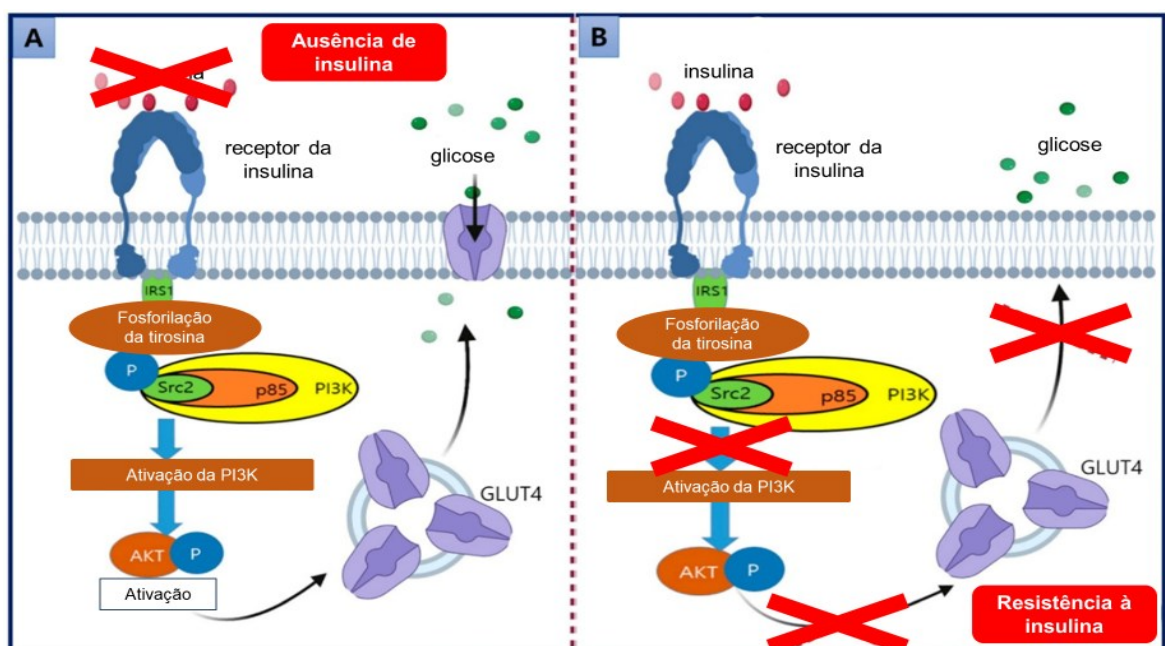
Neste capítulo serão apresentados: os fatores de risco e etiológicos que contribuem para o estabelecimento da doença renal do diabetes; a definição, etimologia e fisiopatologia da doença, bem como suas manifestações clínicas. Também será descrito o estado da arte no uso do inibidor do cotransportador de sódio-glicose-2 e do exercício físico, separadamente, enquanto mecanismos de combate à doença. Nesse contexto, analisar-se-ão as interações também isoladas de ambos nos ambientes redox, inflamatório e metabólico muscular.

3.1 OBESIDADE

Com pelo menos 1 bilhão de pessoas atualmente obesas, dentre as quais 159 milhões de crianças, e em torno de 5 milhões de óbitos anuais em decorrência do sobrepeso e da obesidade, a necessidade do combate às suas causas e efeitos se torna urgente, em particular e preventivamente na população infantil [2, 4]. Apresentando proporções epidêmicas no cenário mundial e sem sinais de desaceleração, a obesidade é definida como o acúmulo excessivo ou anormal de gordura que representa risco à saúde, estando também associada a hábitos de vida desfavoráveis, como o sedentarismo [31, 32]. Seus parâmetros, estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde de acordo com o IMC – índice de massa corporal, são de 25 ou mais para sobrepeso e de 30 ou mais para obesidade na população adulta [33]. Com base nesses indicadores, foi constatado em 2024, pela primeira vez, que o número de pessoas adultas nas capitais brasileiras com sobrepeso ultrapassou aquele das pessoas com peso normal (38,45% vs. 36,93%), sendo que a obesidade representou outros 24,62% [34]. Dados recentemente publicados pela FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, também em 2024, apontam para 2044 a estimativa de obesidade em 48% da população adulta no Brasil, e outros 27% com sobrepeso [35, 36].

Uma das principais causas da obesidade é a ingestão exacerbada de açúcares por meio de uma dieta hiperlipídica (DHL), gerando excesso de peso e distúrbios metabólicos que podem levar ao T2DM. A glicose é o substrato energético primário da maioria das células e o seu transporte, que ocorre em tecidos sensíveis à insulina, como o músculo esquelético, é fundamental para a sobrevivência humana e vem sendo alvo de atenção na literatura [37, 38]. Falhas no mecanismo de sinalização de células insulino dependentes como miócitos e adipócitos, características no DM tipo 1 (T1DM), ou acúmulo de glicose sanguínea causado pela resistência à insulina (RI) normalmente ocorrida no T2DM, causam diminuição de força e massa muscular, além do aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) (Figura 1) [39-42]. A insulina, um hormônio peptídeo produzido e secretado pelas células β -pancreáticas, regula a absorção da glicose vinda do sangue e destinada às células musculares, adiposas e do fígado. Na RI, ocorre o acúmulo de glicose sérica, que pode levar ao pré-diabetes. Isso faz da insulina o principal componente patogênico de várias doenças metabólicas, como o T2DM [43, 44].

Figura 1. Via da sinalização da insulina em pessoas diabéticas tipos 1 e 2.



Mecanismos que (a) refletem a ausência da insulina, como no diabetes tipo 1 (T1DM); e (b) geram resistência insulínica, como no tipo 2 (T2DM). IRS-1 = substrato 1 do receptor de insulina; PI3K-Akt = fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B; GLUT4 = transportador de glicose 4. Adaptado de: Ahmad, Choi e Lee, 2020.

3.2 DIABETES MELLITUS

Uma das consequências da obesidade que é agravada pela RI é o DM, um distúrbio metabólico intermediário com níveis glicêmicos persistentemente elevados. Conforme os indicadores mais recentes da *International Diabetes Foundation*, 10% da população mundial adulta, o que representa quase 540 milhões de pessoas, conviviam com a doença em 2021 [45]. Dados publicados em 2024 pela *American Heart Association* apontam 115,9 milhões de pessoas com pré-diabetes e, se somados às estimativas para 2045, que apontam um aumento de quase 50% no número de pessoas atualmente acometidas pela doença, a projeção é de um possível cenário com mais de um bilhão de pessoas adultas com DM nos próximos 20 anos [46]. Dentre as suas principais manifestações, o T1DM responde por 5-10% dos casos e tem como predicação clássica a deficiência na produção da insulina. Ao identificar a glicose na corrente sanguínea, o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) não ativa a via de sinalização que irá transportá-la para dentro da célula dos tecidos muscular e adiposo. Dentro do seu estado hiperglicêmico característico, o T2DM é responsável por 90% dos casos da doença, em um cenário em que a secreção da insulina causa uma falha funcional progressiva das células β -pancreáticas [6, 45, 47].

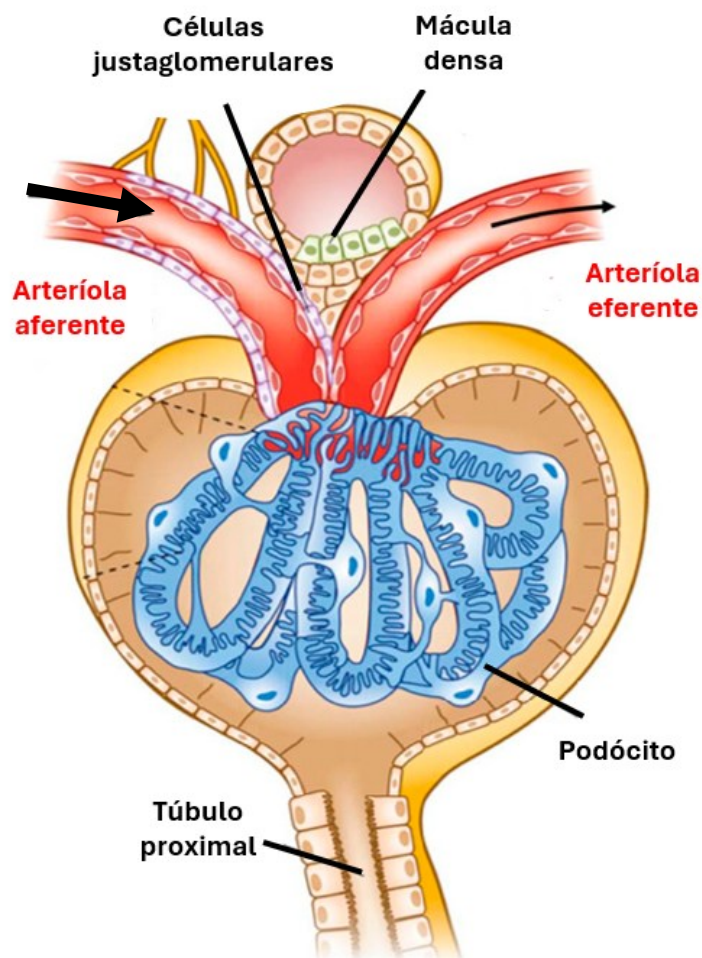
Em estudo que englobou as principais revisões sistemáticas e estudos cohort relacionados ao tema, Tomic, Shaw e Magliano (2022) concluíram que o DM é responsável não apenas pelo desenvolvimento de doenças como a neuropatia, a retinopatia, o derrame cerebral, doenças coronárias e a DRC, mas que também está ligado às chamadas complicações emergentes, como infecções, alguns tipos de câncer e desordens afetiva, cognitiva e funcional [48]. Em ambas as categorias de complicações, conforme a severidade e duração da doença, alguns órgãos como o pâncreas e o rim, e tecidos como o muscular esquelético, têm comprometidas suas funções e atividades em decorrência da RI e, eventualmente, do DM [49, 50].

Sob a perspectiva renal, o DM é tido como um estado de fatura nutricional, no qual cada célula possui vias específicas de reconhecimento e resposta a ação de nutrientes para que a utilização dos seus substratos seja apropriada [51]. Nesse contexto, o músculo esquelético é um tecido metabólico essencial, compondo em média 40% do peso corporal total e sendo responsável pela maioria (85%) da absorção da glicose mediada pela insulina através de um mecanismo altamente coordenado de translocação e fusão do transportador de glicose GLUT tipo 4 (GLUT4) na membrana celular. O GLUT4 se diferencia dos outros membros da família GLUT nos mamíferos pela sua total dependência da insulina por ser expresso de maneira acentuada nas células do músculo esquelético. Sua quantidade está correlacionada com a capacidade de transporte da glicose em resposta à ação da insulina e às contrações musculares [52-54]. Portanto, a falha muscular no consumo da glicose e seu impacto direto no mecanismo da RI, que por sua vez impede a absorção dessa molécula e faz com que se estabeleça um persistente quadro hiperglicêmico na corrente sanguínea, criam um ambiente bastante favorável ao desenvolvimento de doenças relacionadas, dentre elas a obesidade, o DM e a DRD [55, 56].

3.3 DOENÇA RENAL DO DIABETES

A DRD, uma forma de DRC, é uma complicação crônica do diabetes mellitus que causa danos progressivos aos rins. Essa relação causal é caracterizada pelo diagnóstico igual ou superior a 3 meses de queda na taxa de filtração glomerular abaixo dos 60mL/min, ou de lesão estrutural renal com níveis de albuminúria/creatinina superiores a 30mg/dia. A DRD causa perda progressiva, irreversível e em muitos casos assintomática da função do órgão. Esse cenário, demonstrado na Figura 2, gera aumento da pressão e hiperfiltração glomerulares levando a uma potencial glomeruloesclerose, fibrose tubulointersticial e ao espessamento da membrana basal [11, 57-59].

Figura 2. Mecanismo hemodinâmico da doença renal do diabetes.



Mecanismo hemodinâmico da doença renal do diabetes, que causa vasodilatação da arteríola aferente e vasoconstricção da artéria eferente, levando a possíveis danos na taxa de filtração glomerular. Adaptado de: Tonneijck et al., 2017.

3.3.1 Inflamação na Doença Renal do Diabetes

No T1DM, uma reação autoimune ataca as células β -pancreáticas impedindo a produção e secreção de insulina, comprometendo a captação de glicose pelas células musculares e adiposas, gerando um estado hiperglicêmico. Esse cenário obriga a elevação da quebra de proteínas musculares, gerando o processo de proteólise, que contribui para a perda de massa e função muscular, podendo levar a atrofia muscular e sarcopenia [60-62]. No T2DM, um processo multifatorial que envolve predisposição genética, sedentarismo e a obesidade muitas vezes ocasionada pela DHL, a resposta inflamatória crônica do organismo

compromete a ação da insulina. Isso ocorre, em parte, devido à fosforilação inibitória do IRS-1 e à diminuição da expressão e/ou translocação do GLUT4, dificultando a entrada de glicose nas células musculares. O excesso de glicose na corrente sanguínea é então convertido em gordura e armazenado no tecido adiposo, aumentando o teor de lipídios nesse tecido e perpetuando a hiperglicemia crônica característica do T2DM, ainda que o tecido adiposo continue a captar parte da glicose via GLUT4. Essa hiperglicemia, em conjunto com outros fatores como a obesidade, a inflamação e a lipotoxicidade, pode levar à disfunção mitocondrial no músculo esquelético, contribuindo para o desenvolvimento e agravamento da RI. [60, 63, 64]. Esse estado hiperglicêmico crônico pode ainda, com o passar do tempo, causar danos no sistema circulatório gerando placas de aterosclerose, mau funcionamento renal e nervoso, comprometer os vasos sanguíneos dos pés e olhos, elevando assim o risco de diversas doenças. Desta forma, em linhas gerais, ambas as privações total ou parcial da insulina fazem com que o sistema imunológico, que age como primeira linha de defesa do organismo, encare a DRD através da ação dos macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias e ERO, ilustrando a complexidade com que a DRD afeta os mecanismos inflamatório e muscular [65-67].

3.3.2 Mecanismo Redox na Doença Renal do Diabetes

O estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de diversas condições patológicas, estando envolvido no início e/ou progressão de doenças como o câncer, a aterosclerose, doenças pulmonares e cardiovasculares, distúrbios neurológicos e o DM [68]. No âmbito molecular, a cascata de efeitos ocasionada pela DRD causa desequilíbrio no mecanismo de oxirredução, fazendo com que a produção de radicais livres possa gerar estresse oxidativo. Tal afirmação é constatada em recente revisão do estado da arte sobre o papel das ERO na DRD, na qual Ma e colaboradores (2023) relatam a sua função enquanto

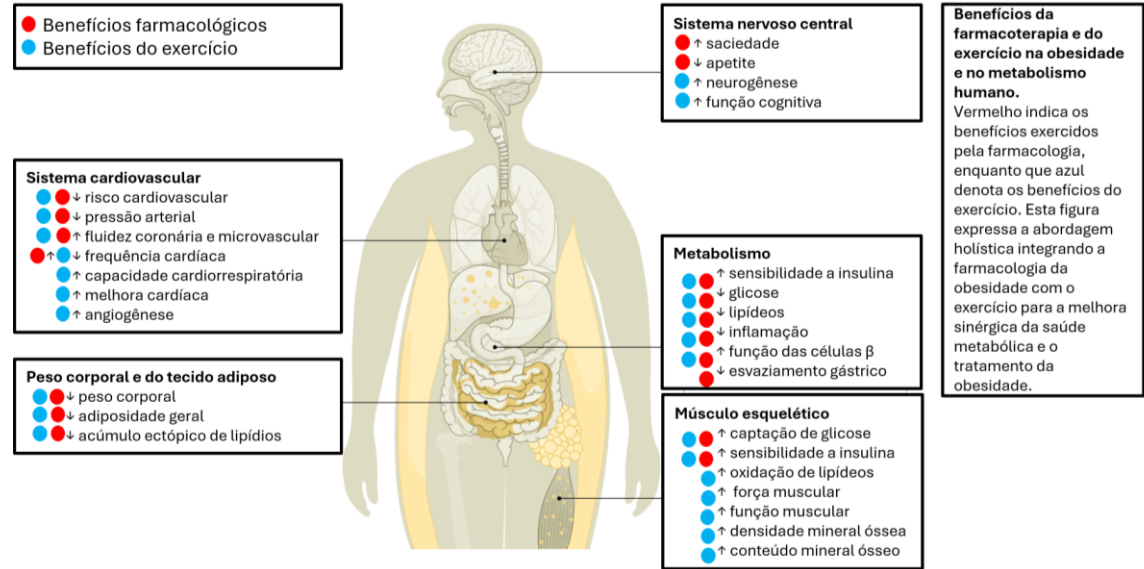
elemento crucial no desenvolvimento e na progressão da doença. Os autores afirmam que a DRD, induzida por altos níveis de glicose, leva a um aumento na produção de ERO, as quais contribuem significativamente para os mecanismos patogênicos da doença [69]. No ambiente redox, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem ação redutora e oxidante, contribuindo na ativação de vias de sinalização celular e na modulação da resposta autoimune, enquanto o seu excesso pode levar à perda da função e eventual apoptose muscular [70]. A catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) são enzimas antioxidantes que neutralizam os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e decompõem o H_2O_2 , utilizando a glutathiona, respectivamente, para proteger a célula contra o estresse oxidativo. No mesmo ambiente, o malondialdeído (MDA) realiza o papel de marcador de dano oxidativo e a proteína carbonila pode exacerbar o dano oxidativo no corpo [68, 71]. Desta forma, pode-se afirmar que o estado hiperglicêmico sérico presente na DRD leva à intoxicação por substâncias intermediárias, em particular as ERO, fazendo com que a oxidação aumentada de substratos mitocondriais venha a gerar produção de $O_2^{\cdot-}$ em demasia. Essas reações, juntas, podem causar disfunção celular, inflamação, apoptose e fibrose em células expostas ao fluxo excessivo da glicose [72].

3.4 EXERCÍCIO FÍSICO

A utilização do aparato muscular esquelético do corpo humano, por meio da prática regular do exercício físico, é capaz de promover efeitos similares aos da insulina através dos estímulos que o músculo proporciona para a captação da glicose circulante no sangue, desta forma diminuindo a resistência periférica do organismo a própria insulina [73, 74]. Durante o exercício, o músculo esquelético age como uma espécie de repositório de glicose na forma de glicogênio, auxiliando assim o corpo a buscar a sua homeostase por meio de difusão facilitada [75-77]. Além disso, o exercício promove perda de peso, redução da pressão

arterial, aumento da massa magra, melhora do perfil lipídico e da função renal como benefícios resultantes de um mecanismo de ação não-farmacológica no enfrentamento de diversas doenças, como a DRD [55, 78, 79]. Em recente análise clínica publicada por Butragueño e Ruiz (2024), o potencial adjunto do uso do exercício e medicamentos no tratamento e combate à obesidade estabelece uma ‘aliança metabólica’ entre esses dois agentes, com os autores relatando os benefícios causados pela utilização de cada um deles separadamente [80], conforme descrito na Figura 3.

Figura 3. Benefícios da farmacoterapia e do exercício na obesidade e metabolismo.



Benefícios da farmacoterapia e do exercício na obesidade e no metabolismo humano. **Vermelho** indica os benefícios exercidos pela farmacoterapia, enquanto **azul** denota os benefícios do exercício. Esta figura destaca a abordagem holística de integrar a utilização da farmacologia no combate à obesidade, juntamente do exercício, para melhorar sinergicamente a saúde metabólica. Adaptado de: Butragueño e Ruiz, 2024.

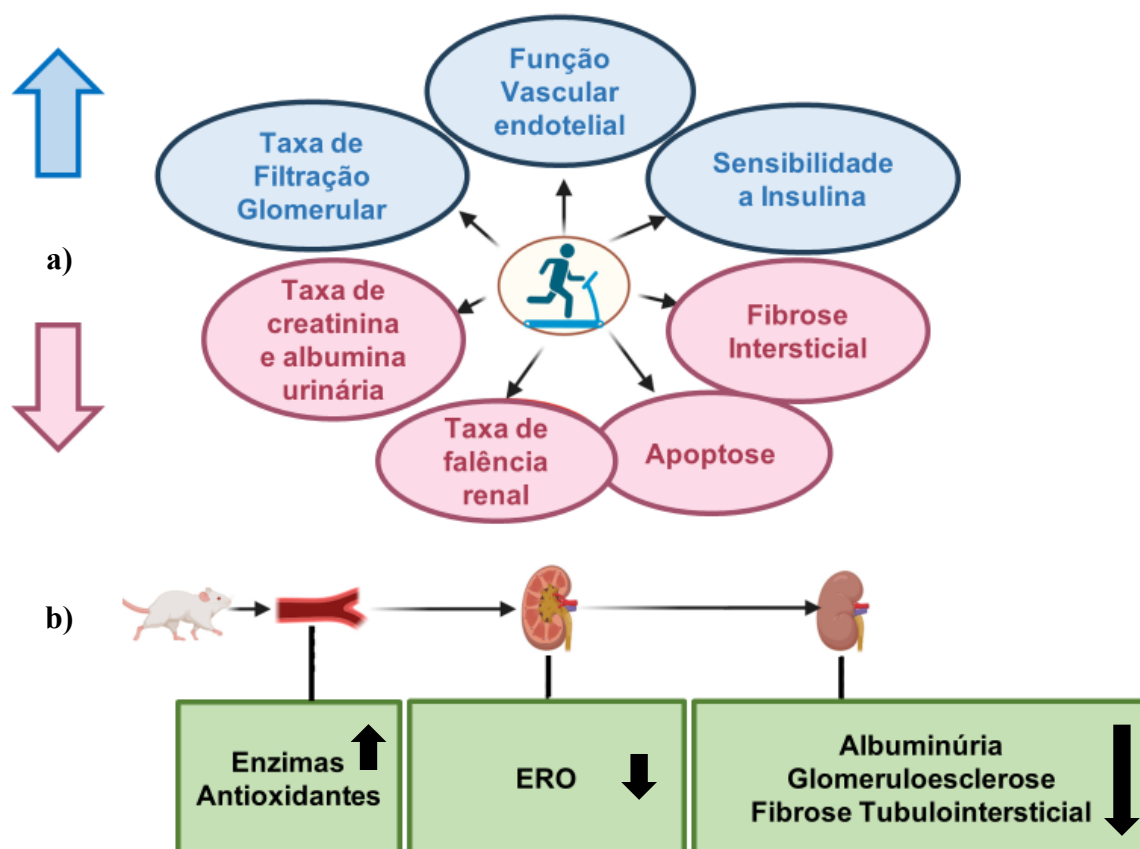
A OMS – Organização Mundial de Saúde recomenda que a prática semanal para a população adulta seja de 150-300 minutos em intensidade moderada, 75-150 em intensidade vigorosa, ou alguma combinação equivalente entre elas. Aconselha-se ainda que ambas as faixas etárias também se utilizem de atividades de fortalecimento muscular aliadas àquelas que visem reduzir comportamentos sedentários [81]. Há diversas modalidades de exercício, como, por exemplo, as de curta e longa duração, as de força e resistência, além de métodos

intervalados. O exercício leve e moderado, composto por movimentos repetitivos e contínuos que recrutam grandes grupos musculares, eleva a frequência cardíaca e a respiração, demandando maior consumo de oxigênio. Essa demanda energética intensificada promove a queima de calorias e gordura, auxiliando na perda de peso. Além disso, o exercício de intensidade leve e moderada fortalece o sistema cardiovascular, melhora a resistência física, aumenta o metabolismo basal e contribui para a saúde mental, reduzindo o estresse e melhorando o humor. A combinação desses benefícios faz do exercício aeróbico uma ferramenta essencial para quem busca emagrecer de forma saudável e sustentável [81, 82].

3.4.1 Exercício Físico e a Doença Renal do Diabetes

Com a instalação da obesidade, o organismo desencadeia uma inflamação crônica sistêmica e de baixo grau que gera o estresse do retículo endoplasmático, a disfunção mitocondrial, a hipóxia e o estresse oxidativo em geral, condições que podem levar ao DM e DRD. Uma vez instalado o quadro da DRD no organismo, o músculo esquelético também tem comprometida a sua função mitocondrial, além de sofrer alterações na sua vascularização, função nervosa, composição de fibras e, eventualmente, a caquexia [83]. Em contrapartida, o mecanismo de aumento de demanda energética durante a execução do exercício gera vários benefícios à saúde, conforme já relatado, e o consumo também elevado de oxigênio se transcreve em aumento nas ERO visando regular o balanço redox e gerar respostas antioxidantes [84]. Essa utilização, quando sustentada majoritariamente pela gordura visceral, diminui a RI em um cenário que contribui para a utilização de uma porção ainda maior da glicose que é estimulada pela insulina, em que maiores níveis de massa magra proporcionam melhor efeito na homeostase da glicose, conforme ilustrado na Figura 4 [30, 85, 86].

Figura 4. Efeitos protetivos do exercício no combate à doença renal do diabetes.



Efeitos protetivos ocasionados pela utilização do exercício no combate à doença renal do diabetes em humanos (a) e em estudos animais (b). ERO = espécies reativas de oxigênio. Adaptado de: Li e Guo, 2024.

Além dessas respostas, o exercício de intensidade leve e moderada apresenta melhoras também na função metabólica como um todo, com exemplos na obesidade [87], na saúde cardiometabólica [29], na neuropatia [88] e na diminuição dos riscos relacionados a função renal e redução de albuminúria e, eventualmente, no combate a DRD [21, 89]. A utilização do exercício enquanto ferramenta não-farmacológica no combate à DRC é também evidenciada em recente publicação de Baker e colaboradores (2022), na primeira diretriz global do gênero baseada em evidências obtidas de pessoas com DRC, incluindo aquelas em diálise e transplantadas, nas quais os efeitos do exercício regular são extensamente descritos e a sua realização é encorajada, objetivando aumento da massa magra e diminuição da gordura, que proporcionam melhoras principalmente nos níveis glicêmicos séricos, na diminuição da resistência à insulina e no estado geral de saúde [23].

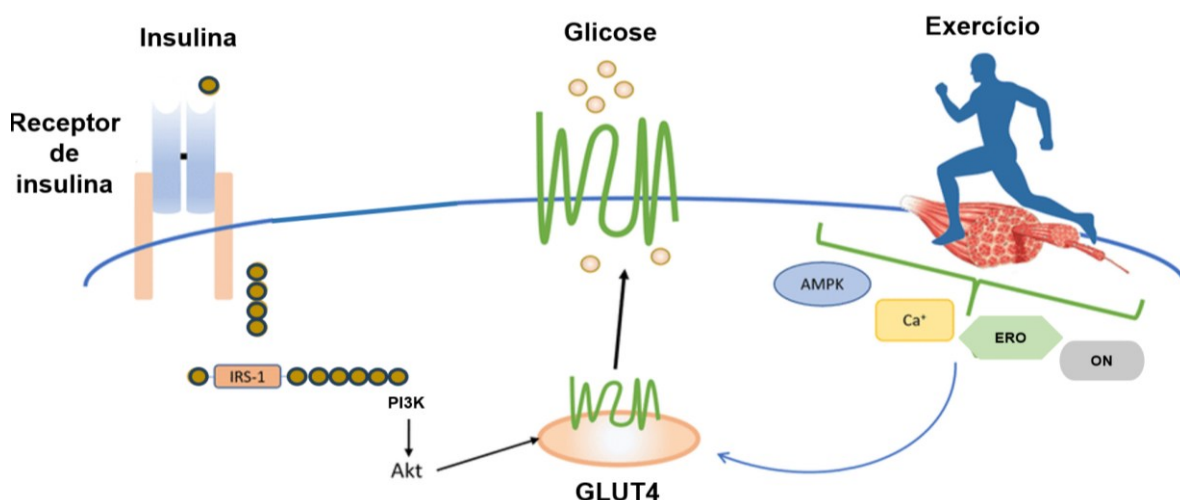
3.4.2 Exercício Físico, Regulação Redox e Resposta Inflamatória

O consumo de oxigênio celular, que durante a prática do exercício é aumentado pelo fato de o organismo tentar suprir a demanda metabólica das fibras musculares, é tido como exacerbado. Entretanto, apenas 2-5% do oxigênio captado pelas fibras musculares são responsáveis pela formação de radicais livres através do aumento da fosforilação oxidativa durante a respiração mitocondrial, o que resulta em estresse oxidativo [90, 91]. Em revisão conduzida sobre a ação antioxidante e anti-inflamatória do exercício moderado regular na prevenção da progressão do T2DM, Teixeira-Lemos e colaboradores indicam a sua prescrição como mecanismo auxiliar, recomendação essa alinhada a autoridades como a *American Diabetes Association* e a *European Association for the Study of Diabetes*, que sugerem a prática do exercício como mecanismo alternativo aos medicamentos utilizados no tratamento e diminuição dos níveis inflamatórios e metabólicos da doença [92]. Diversos estudos mais recentes também relatam que, em condições normais, o aumento de radicais livres está aliado à diminuição de antioxidantes em células musculares esqueléticas e adipócitos, ainda que a capacidade antioxidativa também possa ser elevada como reflexo do exercício, desencadeando respostas inflamatórias moduladas benéficas ao organismo, bem como a própria regulação da homeostase redox por meio de vias moleculares [93-95].

No ambiente celular (Figura 5), a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), considerada um dos melhores sensores da glicose muscular, tem a sua expressão e atividade modificadas durante a prática do exercício físico visando sinalizar os vários efeitos na busca pela homeostase celular, como regeneração, biogênese mitocondrial, desregulação da autofagia e outras respostas citoprotetivas que contribuem para o desenvolvimento da DRD [96-98]. Da mesma forma, ao detectar perturbações no equilíbrio oxidante-antioxidante no organismo, uma série de outras reações é desencadeada, ativando vias como a enzima fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B (PI3K-Akt).

Enquanto a AMPK serve como sensor de energia, tendo a sua expressão em excesso associada a várias doenças como a DRD, ao ser ativada, a Akt cumpre o papel de tentar regular a sinalização das moléculas descendentes [72, 99].

Figura 5. Mecanismo de captação da glicose na prática do exercício físico.



Mecanismo de captação da glicose na prática do exercício físico envolvendo vias moleculares que, independentemente da insulina, translocam o GLUT4 para a membrana celular, onde ocorre a captação da glicose presente na corrente sanguínea. IRS-1 = substrato 1 do receptor de insulina; PI3K-Akt = fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B; GLUT4 = transportador de glicose 4; AMPK = proteína quinase ativada por adenosina monofosfato; Ca²⁺ = cálcio; ERO = espécies reativas de oxigênio; ON = óxido nítrico. Adaptado de: Malone, Hulton e MacLaren, 2021.

As reações moduladas pela prática do exercício desencadeiam uma cascata de adaptações moleculares, elevando a expressão de proteínas que asseguram a integridade celular e o aumento de enzimas antioxidantes endógenas e de proteínas de reparo [100-102]. Como exemplo, pode-se citar elevação na GPx [103-105], redução da peroxidação lipídica via MDA [104] e do balanço pró- e anti-inflamatório do organismo via interleucinas IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral α (TNF α) [106]. Em estudo que descreveu a função do exercício enquanto meio não invasivo de regulação redox e das respostas antioxidantes, Thirupathim, Gu e Pinho (2021) descrevem evidências sobre o seu efeito na melhora da imunidade, independentemente de reações redox, e diminuição das respostas inflamatórias autoimunes, reforçando o papel fundamental exercido pelo exercício na saúde [107].

3.5 COTRANSPORTADORES DE SÓDIO-GLICOSE

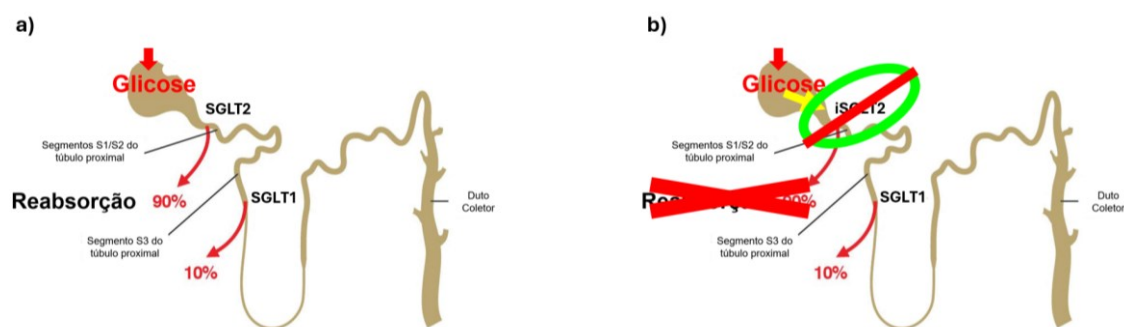
Os cotransportadores de sódio-glicose (SGLT) constituem uma grande família de proteínas de membrana que atuam no transporte de glicose, íons, vitaminas e aminoácidos, definidos como cotransportadores transmembrana essenciais na regulação glicêmica. Seus dois subtipos mais estudados são o SGLT2 e o SGLT1. Esse último é responsável por aproximadamente apenas 10% da reabsorção da glicose filtrada pelo rim [13, 108]. O SGLT2 se localiza na membrana apical das células proximais dos túbulos renais em seu segmento S1, tendo baixa afinidade e alta capacidade de reabsorção da glicose filtrada pelo rim (em torno de 90%), que, quando reabsorvida, é transferida para o interstício por meio de difusão facilitada através do GLUT [14, 109, 110]. Se a capacidade diária estimada (180 mg/dL) de um adulto reabsorver glicose no glomérulo é ultrapassada, sinais de descontrole glicêmico como a poliúria e a polidipsia são identificados. Essa quantidade excedente que passa pelo rim é detectada em exames de urina. O excesso de glicose gera hipertrofia nas células dos túbulos renais, aumentando a expressão do transportador de SGLT2, ocorrendo desta forma e de maneira paradoxal um aumento na capacidade de reabsorção da glicose através desse transportador como mecanismo de preservação de energia [39, 108, 111]. Os níveis glicêmicos já aumentados presentes na corrente sanguínea elevam-se ainda mais, causando secreção também acrescida da insulina e ganho ponderal, caracterizando o papel fundamental da inibição do SGLT2 enquanto possível alvo terapêutico para o controle e gerenciamento do sobrepeso e obesidade, em havendo quadro hiperglicêmico [112].

3.5.1 Inibidores dos cotransportadores de sódio-glicose-2

Um dos agentes terapêuticos mais utilizados no tratamento do T2DM na última década por serem específicos do tecido renal, os inibidores do cotransportador de sódio-

glicose 2 (iSGLT2) têm como principal função reduzir a progressão da doença por meio da diminuição da glicemia através da sua excreção via urina [113, 114]. A sua ação é concentrada nos túbulos renais proximais (Figura 6), restringindo a reabsorção de glicose de forma independente da insulina, ou da função das células β -pancreáticas [113, 115]. A melhora do controle glicêmico, verificada através da regulação da hemoglobina glicada, da glicemia em jejum e pós-prandial e a redução na pressão arterial, relacionadas à redução de peso e de sódio na urina, são benefícios em desfechos cardiovasculares e renais que têm proporcionado destaque no uso dessa classe de medicamentos [116-119].

Figura 6. Mecanismo de ação do iSGLT2.



Mecanismo de ação do iSGLT2. Em indivíduos saudáveis (a), a grande maioria da glicose filtrada pelos rins é reabsorvida pelo SGLT2 nos segmentos S1 e S2 do túbulo contorcido proximal. A glicose restante é reabsorvida pelo SGLT-1 no segmento S3. A ação dos iSGLT2 (b) visa bloquear essa reabsorção. SGLT = cotransportador de sódio glicose; iSGLT2 = inibidor do cotransportador de sódio-glicose-2. Adaptado de Chao, 2014.

As células dos túbulos renais, quando expostas a níveis glicêmicos elevados e de maneira crônica, aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, alterando o seu metabolismo de modo a elevar as ERO [120]. Isso sugere que os iSGLT2 podem causar a diminuição desses efeitos por meio do mecanismo anteriormente descrito que visa inibir a reabsorção da glicose pelas células do túbulo proximal [121]. Além disso, o uso dos iSGLT2 vêm demonstrando, através da inibição da atividade de macrófagos, melhoras na redução de marcadores pró-inflamatórios [122, 123], além da supressão de vias moleculares envolvendo receptores de reconhecimento padrão do sistema imune [121, 124, 125]. A utilização dos

iSGLT2 vem apresentando melhoras também na redução da geração de radicais livres [111, 126, 127] e na regulação do sistema antioxidante [128-131].

Dadas as evidências até aqui apresentadas, a aplicação de um protocolo de exercícios físicos regulares de intensidade leve e moderada pode atuar como ferramenta auxiliar de forma sinérgica na ação medicamentosa ao enfrentamento da DRD, servindo de alicerce para a estagnação ou redução da doença e no combate às demais condições que podem contribuir para o seu desenvolvimento.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a utilização do exercício físico regular, de caráter leve e moderado, associado ou não ao iSGLT2 nas adaptações redox, inflamatória e metabólica muscular em um modelo de DRD experimental (DRDe).

4.2 ESPECÍFICOS

- a. Estabelecer a eficácia e comparar os efeitos do modelo experimental de DRD entre os grupos Sham e DRDe;
- b. Avaliar os efeitos do exercício físico e do iSGLT2, de forma isolada ou combinada, sobre a variação de peso e consumo alimentar desses animais;
- c. Avaliar os efeitos do exercício físico e do iSGLT2, de forma isolada ou combinada, sobre o sistema redox muscular desses animais;
- d. Avaliar os efeitos do exercício físico e do iSGLT2, de forma isolada ou combinada, sobre a resposta inflamatória muscular induzida pela DHL desses animais;
- e. Avaliar os efeitos do exercício físico e do iSGLT2, de forma isolada ou combinada, sobre a via de sinalização da insulina no músculo esquelético desses animais.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

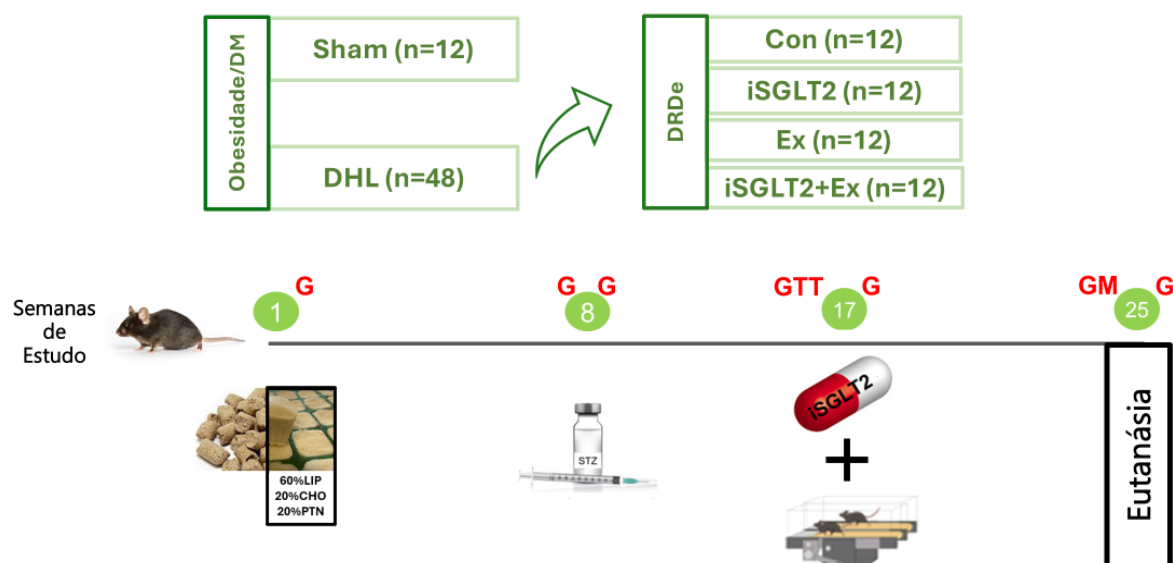
5.1 PROCEDIMENTOS BIOÉTICOS

Todos os procedimentos foram realizados seguindo as recomendações do ARRIVE 2.0 e as normas e princípios éticos do COBEA. O presente projeto obteve aprovação do CEUA da Universidade Federal do Paraná – UFPR, sob protocolo 23075.018158/2021-09 (R.O. 03/2021), datado de 27/04/2021.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Camundongos C57BL/6J (n=60) machos, com 60 dias de idade, pesando entre 20 e 25g, provenientes do biotério da FIOCRUZ – Curitiba, Brasil, foram alojados em caixas de polipropileno com até 4 animais cada e mantidos em condições ambientais de temperatura constante (25°C), sendo submetidos ao ciclo dia/noite de 12 horas. Após período de quarentena com duração de 20 dias, os animais foram divididos randomicamente em dois grupos: (1) dieta padrão (Sham, n=12) e (2) hiperlipídica (DHL, n=48). Durante 16 semanas receberam livre consumo alimentar e hídrico. Na 17ª semana, os animais DHL foram subdivididos em: grupo controle (Con) (n=12); grupo iSGLT2 (n=12); grupo Ex (n=12); e grupo iSGLT2+Ex (n=12). A Figura 7 demonstra o desenho do protocolo experimental do estudo.

Figura 7. Desenho do estudo experimental.



DM = diabetes mellitus; **DHL** = dieta hiperlipídica; **DRDe**: doença renal do diabetes experimental; **Con**: controle; **iSGLT2**: inibidores do cotransportador de sódio-glicose-2; **Ex**: exercício físico; **G**: glicemia; **GTT**: teste oral de tolerância à glicose; **GM**: gaiolas metabólicas; **LIP**: lipídios; **CHO**: carboidratos; **PTN**: proteínas; **STZ**: estreptozotocina.

5.3 INDUÇÃO DA DOENÇA RENAL DO DIABETES EXPERIMENTAL

A DRDe foi induzida de acordo com as diretrizes do Consórcio de Complicações Diabéticas em Modelos Animais [132]. Para isso, foi empregada a associação da estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich, EUA) com a DHL [133]. Por ocasionar toxicidade nas células β -pancreáticas causando redução na produção de insulina, a STZ foi utilizada para promover alterações típicas do T1DM e, com a DHL, induzir a obesidade característica do T2DM nos animais. Buscou-se, com esses estímulos associados, gerar intolerância à glicose e alteração da função renal, peculiares da DRD [134, 135]. A dieta padrão (DP) foi constituída de 18% de gorduras, 24% de proteínas e 58% de carboidratos (Laboratório Nuvilab, Brasil) e mantida em temperatura ambiente, enquanto a DHL foi composta de 60% de gorduras, 20% de proteínas e 20% de carboidratos (PRAG Soluções, Brasil) e mantida sob congelamento. As composições das dietas podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas.

Dieta Padrão - DP (Nutrilab)		
Ração Padrão Nuvilab CR-I®		
Energia	kcal/100g	295kcal
	g/100g	40,5g
Carboidrato	Percentual de energia	55%
	g/100g	16,2g
Proteína	Percentual de energia	22%
	g/100g	1,5g
Lipídeo	Percentual de energia	4,5%
Fibra	g/100g	7g
Sódio	mg/100g	0,27mg
Dados fornecidos pelo fabricante		

Dieta Hiperlipídica - DHL (Prag Soluções)			
PRAG SOLUÇÕES biociências			
Linha de Dietas Hiperlipídicas para Experimentação Animal			
	Quant p/p	Kcal	% das Kcal
1 -Dieta Hiperlipídica 20-20-60% BAN (cod 35)			
AMIDOS	16,15%	646	12,32%
CASEINA	25,85%	1034	19,72%
SACAROSE	8,90%	356	6,79%
OLEO DE SOJA	3,23%	290,7	5,54%
FIBRA	6,46%	0	0,00%
MIX MINERAL	1,29%	0	0,00%
FOSTATO DE CALCIO	1,68%	0	0,00%
CARBONATO DE CALCIO	0,71%	0	0,00%
CITRATO DE POTASSIO	2,13%	0	0,00%
MIX VIT	1,29%	52	0,98%
L CISTINA	0,39%	16	0,30%
COLINA	0,26%	0	0,00%
BANHA	31,66%	2849,4	54,34%
	100,00%	5243	100,00%
fonte proteica		20,02%	
fonte lipidica		59,89%	
fonte cho		20,09%	
		100%	

Fontes: Laboratório Nuvilab, Brasil; PRAG Soluções, Brasil.

Na oitava semana de livre consumo, a eficácia do modelo experimental foi verificada. A glicemia dos animais foi aferida para a confirmação do estado hiperglicêmico por amostra sanguínea de veia caudal através da utilização de uma tira de teste para glicose sanguínea (Bayer Breeze 2, EUA). Os animais DHL receberam, após jejum de 12 horas, aplicação da STZ por dose única via intraperitoneal (Sigma-Aldrich, EUA) (40mg/kg) dissolvida em citrato de sódio 10 mM e mantida em pH 4,5. Em função da instabilidade da droga, a STZ foi aplicada em até 10 minutos após a sua dissolução. Água e comida *ad libitum* foram fornecidos a todos os animais 1 hora após a injeção. Depois de 72 horas, a medição da glicemia foi realizada novamente e, aqueles animais com níveis em torno de 180mg/dL ou superior, após 6 horas de jejum, foram mantidos no estudo. Os animais excluídos do estudo foram eutanasiados e descartados de acordo com o protocolo padrão recomendado pelas autoridades sanitárias.

5.4 TRATAMENTOS

Após 17 semanas, os animais submetidos à DHL foram subdivididos em seus respectivos grupos experimentais. A partir de então, receberam o medicamento e/ou foram expostos a um programa de exercícios por 8 semanas consecutivas. O iSGLT2 (35mg/kg) foi administrado via gavagem, utilizando-se empagliflozina (EMP) 25mg de nome comercial Jardiance® (Boehringer Ingelheim, Alemanha). O fármaco foi primeiramente triturado, seguido da dispersão em hidróxi-etil-celulose (0,5%). A dosagem utilizada é proporcional àquela praticada em humanos [136], conforme protocolo seguido por estudos prévios [111, 137-141]. Os animais Sham receberam apenas veículo, administrado pelo mesmo processo.

Para o programa de exercícios físicos, os animais foram inicialmente ambientados em esteira ergométrica (10m/min sem inclinação, 10min/dia). Na 17ª semana, foi realizado um teste de velocidade máxima (TV_{max}), descrito na Tabela 2. O programa de exercícios (Tabela 3) teve então início, com duração de 60 dias em sessões de até 50 minutos a cada 48 horas, intensidade de esforço progressiva (60 a 80% do valor obtido no TV_{max}) e velocidade de 10 a 18m/min, adaptado de Vilela et al. (2019) [142]. De modo a seguir o protocolo e preservar a integridade física dos animais, quando observado que algum deles manteve-se no fundo da baía pela 3ª vez após 5 segundos de permanência, o mesmo foi retirado da rotina daquele dia. Não foram utilizados estímulos para incentivar os animais a realizarem a prática de exercícios.

Tabela 2. Teste de velocidade máxima.

Velocidade (m/min)	Tempo (min)	Inclinação (%)
6	3	10
10	3	10
13	3	10
16	3	10
19	3	10
22	3	10
25	3	10
28	3	10

Fonte: o autor (2022).

Tabela 3. Protocolo de exercício físico.

Semana	Intensidade (% da TV_{max})	Velocidade (m/min)		Inclinação (%)	Tempo (min)
		DP	DHL		
Adaptação	40	12	10	0	10
1	40	12	10	0	30
2	50	15	12	0	40
3	50	12	12	0	50
4	60	18	15	0	50
5	60	18	15	0	50
6	60	18	15	0	50
7	70	18	15	0	50
8	80	18	15	0	50

TV_{max} = teste de velocidade máxima; DP = dieta padrão; DHL = dieta hiperlipídica. Fonte: o autor (2022).

5.5 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

5.5.1 Massa corporal e consumo alimentar

A massa corporal média dos animais foi mensurada a cada 15 dias, utilizando-se uma balança de precisão de 0,001g (Filizola, Brasil). O consumo alimentar foi quantificado a cada 48 horas através da diferença obtida entre o peso da ração inserido nas caixas (g) e aquele restante no momento da pesagem.

5.5.2 Indicadores Renais

Para avaliação dos indicadores renais, exceto aqueles pertencentes aos dois grupos submetidos ao protocolo de exercícios, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas dois dias antes do fim do período experimental para obtenção de amostra de urina (ml) de 24 horas. Todas as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos e mantidas a -80°C até a análise. A albumina urinária foi quantificada pela eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%, por meio da migração de partículas carregadas sob a influência de um campo elétrico em uma matriz viscosa, sendo a mobilidade eletroforética das partículas diretamente proporcional à carga e inversamente proporcional à viscosidade do meio. Para tanto, a urina foi diluída numa concentração 1:20 e misturada a uma solução tampão contendo o agente redutor β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich, EUA) [143]. O gel foi corado com azul de Comassie e a albumina foi mensurada usando um sistema de fotodocumentação de géis e membranas (ChemiDoc, Bio-Rad Laboratories, Inc). A glicosúria foi determinada por método enzimático (glicose oxidase) utilizando kits comerciais (Glicose PAP Liquiform, Labtest[®]), de acordo com a recomendação do fabricante.

5.5.3 Glicemia

Os níveis glicêmicos foram avaliados em jejum nas semanas 1 (Basal), 17 (Pré-treinamento) e 25 (Pós-treinamento) com glicosímetro (Breeze 2; Bayer, EUA) através de amostra de sangue (5 μL) obtida da veia caudal dos animais com seringa heparinizada, após período de jejum de 6 horas iniciado às 8h da manhã.

5.5.4 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Na 16ª semana de estudo, foi realizado o GTT nos grupos Sham e DRDe, com avaliação inicial em tempo zero após 12 horas de jejum e posterior administração intraperitoneal de solução de D-glicose a 20% (2g/kg de peso). A leitura da glicemia foi então realizada por meio de glicosímetro (Breeze 2; Bayer, EUA), por amostra de sangue obtida através da veia caudal após 15, 30, 60 e 120 minutos da sua aplicação.

5.6 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical 48 horas após a última sessão de treinamento. A perda amostral e número final de animais utilizados pode ser encontrada no Capítulo 11 deste estudo – Material Suplementar. Tricotomia e desinfecção foram realizadas para a retirada do rim esquerdo e dos músculos sóleo, gastrocnêmio e quadríceps. Após a extração, os rins esquerdos de 6 animais do grupo Sham e DRDe foram perfundidos com solução (Du Boscq, Brasil) para fixação e imediatamente emergidos em solução formol 10% (Sigma Aldrich, Brasil) para posterior parafinação. Os músculos de todos os animais experimentais foram previamente emergidos em solução salina para remoção de coágulos e sangue remanescente, secados em papel filtro grau 541 de 150 mm (Whatman, EUA), sendo então mergulhados em nitrogênio líquido (N₂L) (Air Liquide, Brasil) e, posteriormente, armazenados em freezer -80°C. O restante dos tecidos dos animais foi acondicionado em saco branco leitoso e conservado em freezer -40°C para posterior deposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos foram realizados conforme a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA [144].

5.7 ANÁLISES DOS TECIDOS

5.7.1 Análises moleculares

5.7.1.1 Produção de ERO

Para os ensaios de parâmetros redox foram utilizados 30 mg do quadríceps, coletado e homogeneizado em 600 µl de tampão fosfato. A mensuração da produção de ERO foi realizada por medição indireta da quantidade de H₂O₂ presente na amostra por kit Amplex[®] Red A22188 (Invitrogen, UK) para produzir a resorufina, um produto altamente fluorescente e detectável. Os resultados foram expressos em µM de H₂O₂/mg de proteína. O princípio do método consiste na reação do 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina com H₂O₂ presente na amostra (1:1) para produzir a resorufina, um produto altamente fluorescente e detectável. Os resultados foram expressos em µM de H₂O₂/mg de proteína. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, a leitura foi realizada a 560 nm. A atividade da GPx foi medida de acordo com Günzler e Flohé (1985) e Weydert e Cullen (2010) [145, 146]. O mesmo tecido foi homogeneizado em 600 µl de tampão fosfato (10x, pH 7,5) e centrifugado a 1000 xg por 10 minutos a 4°C. Utilizando 20 µl do sobrenadante, juntamente com o mix (PB+GR+GSH) e o tampão fosfato, variando a quantidade, de referência ou ensaio. A placa foi incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente, em seguida foram adicionados 5 µl de NADPH apenas nos poços do ensaio. Foi realizada a leitura basal a 37°C (340 nm), por 5 minutos com intervalos de 1 minuto. Por fim, foram adicionados 20 µl de H₂O₂ e realizada uma nova leitura nas mesmas condições já citadas. Os valores foram expressos como µ/mg de proteína.

5.7.1.2 Dano oxidativo em lipídios

A quantificação de MDA foi realizada como indicadora de lipoperoxidação por meio de cromatografia líquida de alta performance – HPLC, de acordo com Tüközan, Erdamar e Seven (2006) [147] e calculada por meio de uma curva padrão preparada a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano. Para a obtenção do composto, foram aplicados 6M de hidróxido de sódio (NaOH) (LabMaster, EUA) em 250µL de amostra, seguido de incubação e adição de ácido perclórico (HClO₄) (Reagen, Brasil) a 35%. Após ter sido realizada uma centrifugação a 15000g por 10 minutos, 25µL de 2-4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (Sigma-Aldrich, Brasil) foram adicionados a 250µL de sobrenadante e incubados por 10 minutos. Dessa mistura, foram injetados 20µL de amostra no equipamento LC Agilent 1200 (Agilent, EUA) utilizando-se um detector de matriz de diodo (DAD), com comprimento de onda de 310nm. A fase estacionária foi composta por uma coluna C18 Phenomenex (Sigma Aldrich, EUA) com 4,6 x 150 mm e tamanho de partícula de 5µm. A fase móvel foi isocrática e composta por 62% de água ultrapura e 38% de metanol grau-HPLC (Merck, Brasil), com fluxo de 1mL/min. Cada corrida teve duração de 12 minutos. O software Agilent OpenLAB CDSO ChemStation Editor (Agilent Scientific Instruments, EUA) foi utilizado para a análise dos dados obtidos.

5.7.1.3 Dano oxidativo em proteínas

O dano oxidativo em proteínas foi avaliado pela determinação de grupos carbonila com base na reação com DNPH. As proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) (Carbon Científica, Brasil), seguido de uma sequência de lavagens com TCA 20%, etanol 70% (Super Vale, Brasil) e acetato de etila (1:1). O volume do precipitado contendo 1mg/mL de proteína foi exposto à reação com DNPH com subsequente formação de uma

proteína conjugada (DNP - dinitrofenilhidrazona) e foi lido espectrofotometricamente a 366 nm. O conteúdo de carbonila foi determinado usando um coeficiente de extinção molar de 22.000 M⁻¹ [148].

5.7.1.4 Marcadores inflamatórios

Uma porção de 30 mg do músculo gastrocnêmio foi homogeneizada em tampão de radioimunoprecipitação RIPA contendo inibidores de protease e fosfatase para garantir a lise celular completa. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo as proteínas totais foi coletado. Em seguida, as amostras foram quantificadas e preparadas para análise utilizando um kit multiplex e analisadas por meio de kit Luminex (Thermo Fisher, EUA), conforme orientação do fabricante. Foi então realizada a adição das amostras na placa multiplex, seguida pela incubação, lavagem e detecção das interleucinas TNF- α , IL-6 e IL-10. Os dados foram analisados via software (GraphPad Prism 10.2, Boston, EUA) e expressos em pg/ml.

5.7.1.5 Sinalização metabólica

A técnica de Western Blotting foi utilizada para avaliar algumas proteínas envolvidas na sinalização do metabolismo da glicose. Aproximadamente 20 mg das amostras do músculo sóleo dos animais foram homogeneizados em tampão de lise (*Ripa Lysis and extraction buffer*; Thermofischer, EUA) com coquetel inibidor de fosfatase (Sigma-Aldrich, EUA; Merck Millipore, Alemanha). O lisado foi centrifugado por 15 minutos (4°C) a 12000 rpm. Uma alíquota do sobrenadante de cada amostra foi utilizada para determinar a concentração de proteína pelo método de Bradford (1976). O restante do sobrenadante foi diluído 4:1 em Laemmli Sample Buffer 4x (cat.1610737; BioRad, EUA), aquecido em banho

seco a 95°C por 5 minutos e imediatamente armazenado a -20°C. Para a técnica de eletroforese, foram pipetadas 30 µg/µL de proteína em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). A corrida foi realizada por 3 horas de acordo com o procedimento padrão (80mA). Posteriormente, foi realizada a transferência das amostras contidas do gel para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL RPN 3032D; Amersham, UK) em tampão de transferência a 20V por 30 minutos, constantemente resfriado em gelo. Foi então realizado bloqueio de ligações inespecíficas com leite (Molico, Nestlé, Brasil) e salina tris-tamponada com tween 20 – TBST 5% durante 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos primários (Tabela 4) como controles endógenos a 4°C *overnight* em agitação, sendo posteriormente realizada lavagem com tampão TBST durante 15 minutos, por 3 vezes. As membranas foram, então, expostas aos anticorpos IgG anti-camundongo ou anti-coelho conjugada a peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente e agitação. O protocolo de lavagens foi utilizado conforme descrito anteriormente. Por fim, a quimioluminescência catalisada por peroxidase (WBKLS0100, Merck Millipore, EUA) foi avaliada através de um quimiodocumentador (General Electric – Amersham Imager 600, UK). As bandas registradas foram escaneadas e a densitometria mensurada pelo programa ImageJ 1.54i (Ad Annihilator Software, USA). Os valores obtidos foram o produto dos valores da proteína de interesse pelos valores da proteína endógena. Já os valores das proteínas fosforiladas foram normalizados pelo valor de suas proteínas totais após estas serem normalizadas pelo controle endógeno [149].

Tabela 4. Lista de anticorpos utilizados como controles endógenos.

Anticorpo	Diluição	kDa	Nº Catálogo	Fabricante
Anti-β-actina	1:1000	42	#F2113	Santa Cruz
Anti-phospho-Akt ser473	1:1000	56	SER473	Invitrogen
Anti-AMPKα-1	1:1000	60	MA5-15815	Invitrogen
Anti-PI3K p85	1:2000	84	ab40755	Abcam

Fonte: o autor (2022)

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados, que foram então analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste post hoc de Tukey. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para dados não paramétricos, seguido do post-hoc de Dun. Ainda, o teste t de Student, ou Mann-Whitney não pareado, foram utilizados para análises comparativas entre os grupos Sham e DRDe. O nível de significância estabelecido no teste estatístico para considerar a diferença mínima intra- e entre grupos foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 10.2 para Windows® como pacote estatístico.

6 RESULTADOS

A apresentação dos resultados obtidos está dividida em dois tópicos. O primeiro refere-se aos indicadores clínicos que refletem a efetividade do modelo experimental de DRD, incluindo variação de peso, consumo calórico, níveis de glicemia e depuração da glicose, bem como níveis da glicosúria e albuminúria. Informações complementares a essas alterações podem ser observadas nos dados suplementares que compõem outra tese do nosso grupo. No segundo tópico, são apresentados os resultados referentes aos efeitos isolados e combinados do exercício físico e do medicamento sobre a musculatura esquelética dos animais analisados.

6.1 EFEITOS DO MODELO DE DRDe SOBRE INDICADORES CLÍNICOS E FUNÇÃO RENAL

6.1.1 Massa corporal

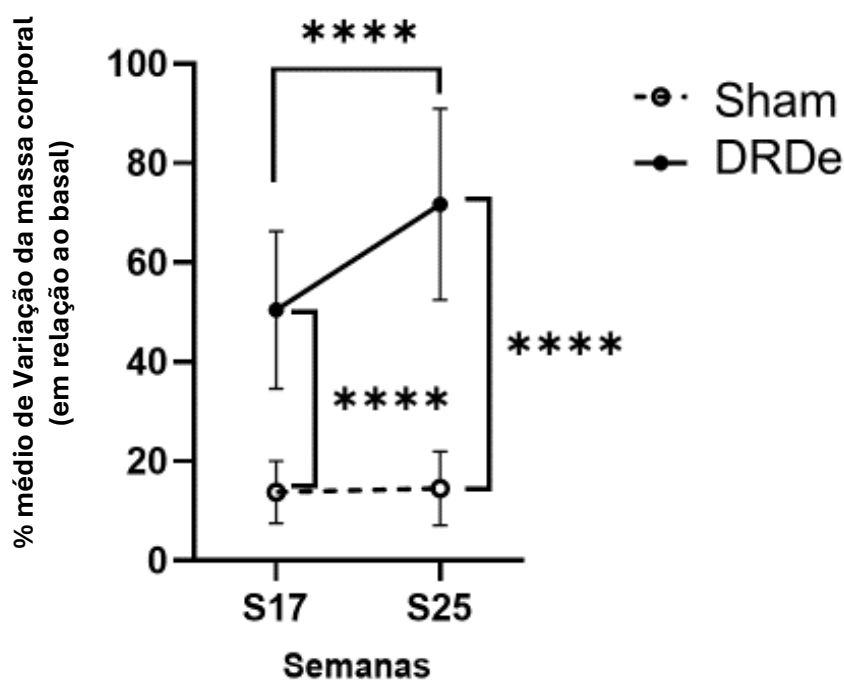
Ambos os grupos Sham (n=12) e DRDe (n=48) foram considerados homogêneos no início deste estudo. Os animais do grupo DRDe apresentaram elevação da massa corporal em relação ao grupo Sham, bem como significativo e gradual aumento de peso na 17^a e 25^a semanas em relação aos patamares basais (Tabela 5), com significativa variação média de elevação da massa corporal (50,4% e 71,6%) nos respectivos períodos analisados, enquanto a variação no grupo Sham ficou abaixo de 15% em ambos (Figura 8).

Tabela 5. Massa corporal mensurada na 1ª, 17ª e 25ª semanas do estudo.

Semanas	Sham			DRDe			Valor p (Sham vs. DRDe)
	Média (g)	DP	n	Média (g)	DP	n	
Basal (S1)	25,05	0,84	11	25,16	0,74	11	NS
S17*	28,45	0,93	11	37,82	3,71	11	0,0001
S25 ⁺	28,64	0,92	11	43,18	4,91	11	0,0001
Valor p (vs basal)	NS			0,0001* ⁺			-

Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Foi realizada a análise de variância de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas com valores menores ou igual a $p=0,05$. S1 = semana 1; S17 = semana 17; S25 = semana 25; g = gramas; DRDe = doença renal do diabetes experimental; DP = desvio padrão; NS = não significante.

Figura 8. Dados de massa corporal de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.



Percentual de variação da massa corporal mensurada na 17ª e 25ª semanas do estudo em relação aos níveis basais dos grupos Sham (n=11) e DRDe (n=11). Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas com $*p < 0,05$. S1 = semana 1; S17 = semana 17; S25 = semana 25; g = gramas; DRDe = doença renal do diabetes experimental. **** $p < 0,0001$.

6.1.2 Consumo calórico médio diário

Conforme observado na Tabela 6, as análises mostram que não houve diferença significativa no consumo calórico médio diário do grupo Sham entre a 1ª semana/S1/basal ($22,5 \pm 4,78$ kcal), a 17ª semana/S17/antes do início do programa de treinamento ($20,88 \pm 0,14$ kcal) e a 25ª semana/S25/pós-treinamento ($20,77 \pm 1,63$ kcal), assim como na comparação com o grupo DRDe ($19,09 \pm 4,99$ kcal). No grupo DRDe, também não foram observadas diferenças estatisticamente relevantes no consumo calórico entre os tempos de análise (S1= $19,09 \pm 4,99$ kcal, S17= $15,41 \pm 1,72$ kcal e S25= $15,45 \pm 1,36$ kcal). Entretanto, o consumo calórico do grupo DRDe foi menor em relação ao grupo Sham na 17ª semana (Sham= $20,88 \pm 0,14$ kcal versus DRDe= $15,41 \pm 1,72$ kcal) e na 25ª semana do estudo (Sham= $20,77 \pm 1,63$ kcal versus DRDe= $15,45 \pm 1,36$ kcal).

Tabela 6. Consumo calórico diário médio de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental – grupos Sham e DRDe.

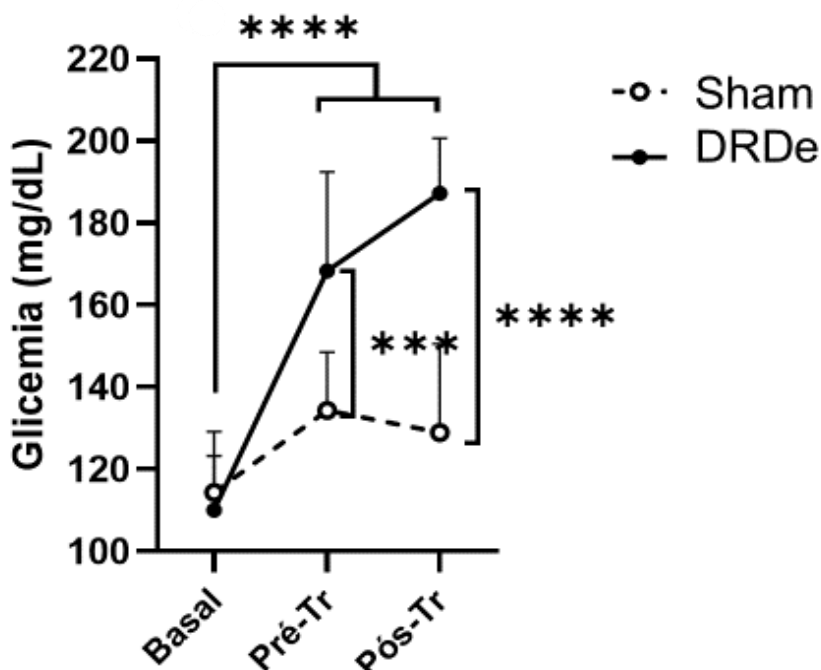
Semanas	Sham		DRDe		Valor p (Sham vs. DRDe)
	Consumo de ração (g)	Consumo energético (kcal)	Consumo de ração (g)	Consumo energético (kcal)	
Basal (S1)	$5,34 \pm 1,13$	$22,5 \pm 4,78$	$2,73 \pm 0,71$	$19,09 \pm 4,99$	0,0910
S17	$4,94 \pm 0,03$	$20,88 \pm 0,14$	$2,20 \pm 0,25$	$15,41 \pm 1,72$	0,0011
S25	$4,91 \pm 0,39$	$20,77 \pm 1,63$	$2,21 \pm 0,19$	$15,45 \pm 1,36$	0,0016
Valor p (vs basal)	NS		NS		-

Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Foi realizada análise de variância de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Foram consideradas como diferenças estatisticamente significativas para os resultados de Kcal valores menores ou igual a $p=0,05$. O $n=11$ em todos os grupos. S1 = semana 1; S17 = semana 17; S25 = semana 25; g = gramas; DRDe = doença renal do diabetes experimental; NS = não significante.

6.1.3 Glicemia

A Figura 9 demonstra que ambos os grupos Sham e DRDe apresentaram níveis séricos de glicemia similares no início do estudo (Sham = $114,33 \pm 14,84$ mg/dL; DRDe = $110,01 \pm 13,12$ mg/dL), sendo que nenhuma diferença significativa foi observada nos diferentes momentos de mensuração no grupo Sham (Basal = $114,33 \pm 14,84$ mg/dL, Pré-Tr = $134,33 \pm 14,19$ mg/dL, Pós-Tr = $128,91 \pm 21,63$ mg/dL). Contrariamente, o grupo DRDe apresentou significativa elevação em seus níveis glicêmicos quando observados os períodos Pré- e Pós-Tratamento (ao qual não foi submetido) em comparação àqueles observados no grupo Sham (Basal = $110,01 \pm 13,12$ mg/dL; Pré-Tr = $168,36 \pm 24,05$ mg/dL; Pós-Tr = $187,27 \pm 13,41$ mg/dL).

Figura 9. Valores de glicose plasmática em animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental – grupos Sham e DRDe

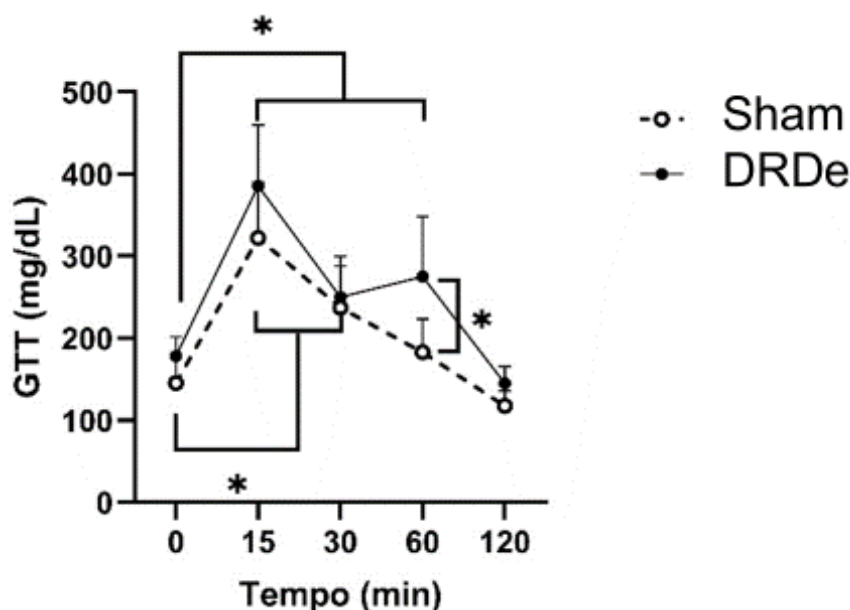


Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão dos grupos Sham (n=12) e DRDe (n=11). Foi realizada análise de variância de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas com $*p < 0,05$. DRDe = doença renal do diabetes experimental, Pré-Tr = pré-tratamento, Pós-Tr = pós-tratamento. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$.

6.1.4 Teste de tolerância à glicose (GTT)

A capacidade de depuração da glicose foi mensurada via GTT após a aplicação da STZ e revelou que os dois grupos apresentaram similar comportamento, com o pico glicêmico de ambos ocorrendo aos 15 minutos. O grupo DRDe apresentou níveis significativamente mais elevados aos 60 minutos (Sham = $133,3 \pm 40,33$ mg/dL; DRDe = $275,20 \pm 70,27$ mg/dL). Aos 120 minutos, ambos os grupos retornaram a valores próximos do tempo zero (Figura 10).

Figura 10. Valores do teste de tolerância a glicose (GTT) em animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.



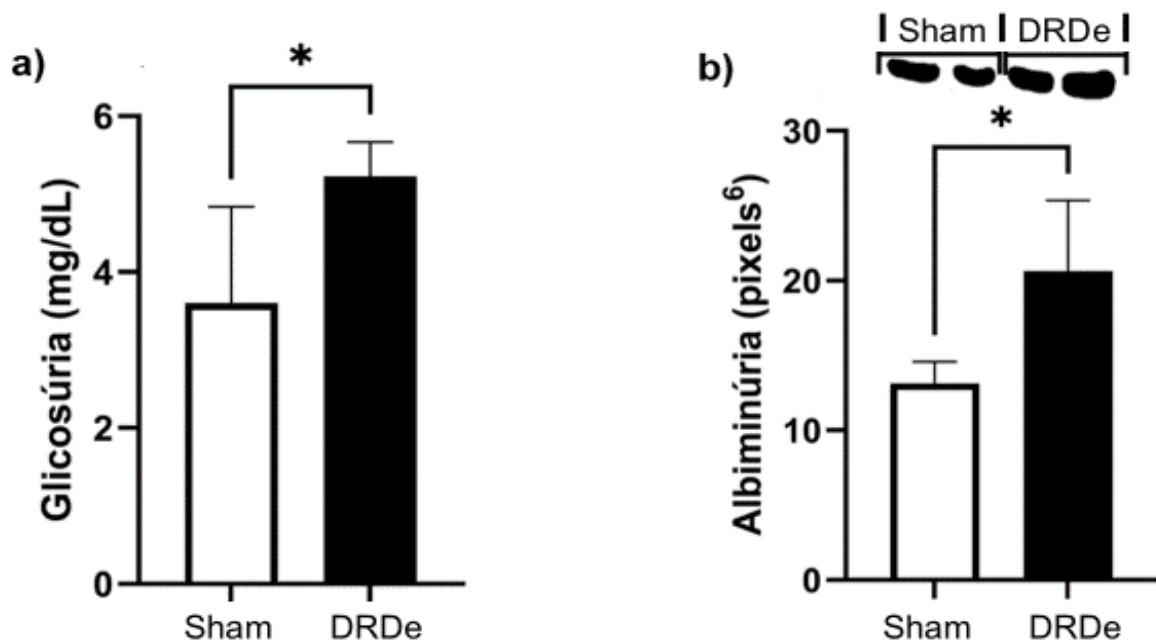
Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão dos grupos Sham (n=10) e DRDe (n=10). Foi realizada análise de variância de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas com $*p < 0,05$. GTT = teste de tolerância a glicose, DRDe = doença renal do diabetes experimental.

6.1.5 Glicosúria e albuminúria

Nos testes de glicosúria e albuminúria, que são indicadores iniciais de distúrbios como a DRC e a DRD, foi observado (Figura 11a) que os animais do grupo DRDe

apresentaram níveis significativamente maiores ($p=0,0241$) de glicose na urina em comparação com o grupo Sham ao final do período experimental (Sham = $3,60 \pm 1,24$ mg/dL, DRDe = $5,23 \pm 0,44$ mg/dL). Resultados também similares foram observados (Figura 11b) nos níveis de albumina urinária (Sham = $27,36^6 \pm 2,02^6$ pixels, DRDe = $35,39^6 \pm 9,24^6$ pixels).

Figura 11. Valores de glicose urinária (a) e albumina urinária (b) em animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.



Os dados de glicosúria (a; Sham n=5, DRDe n=5) e albuminúria (b; Sham n=4, DRDe n=4) estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Para a comparação entre os grupos foi usado o *test t de student* não-pareado e consideradas as diferenças estatisticamente significativas com $*p < 0,05$. DRDe = doença renal do diabetes experimental.

6.2 EFEITOS ISOLADOS E SINÉRGICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO MEDICAMENTO SOBRE A MUSCULATURA ESQUELÉTICA

6.2.1 Massa corporal

Todos os grupos expostos a DRDe apresentaram ganho significativo de massa corporal na 17^a e 25^a semanas em relação aos níveis basais. Adicionalmente, embora não tenham sido observadas mudanças estatisticamente relevantes no período Pós-Tratamento

(25ª semana) em relação ao Pré-Tratamento (17ª semana), as intervenções utilizadas através do exercício apenas e na sua associação com o iSGLT2 promoveram reduções no peso corporal na 25ª semana em comparação com grupo Controle (Tabela 7).

Tabela 7. Efeitos do exercício e iSGLT2 sobre a massa corporal mensurada na 1ª, 17ª e 25ª semanas do estudo.

Semanas	DOENÇA RENAL DO DIABETES EXPERIMENTAL												Valor p vs Controle
	Controle ^a			iSGLT2 ^b			Exercício ^c			iSGLT2+Exercício ^d			
	Média (g)	DP	n	Média (g)	DP	n	Média (g)	DP	n	Média (g)	DP	n	
Basal (S1)	25,16	0,74	11	27,50	0,65	11	26,90	3,44	12	25,35	0,72	11	NS
S17*	37,82	3,71	11	40,44	2,48	11	41,00	7,18	12	37,36	3,57	11	NS
S25+	43,18	4,91	11	41,31	0,68	11	37,02	11,30	12	33,18	0,72	11	0,0001 ^d
Valor p (vs. Basal)	0,0001**			0,0001**			0,0001**			0,0001*, 0,0077 ⁺			-

Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Foi realizada a análise de variância de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas com valores menores ou igual a $p=0,05$. S1 = semana 1, S17 = semana 17, S25 = semana 25, g = gramas, DRDe = doença renal do diabetes experimental, NS = não significante.

6.2.2 Consumo calórico diário médio

Conforme observado na Tabela 8, nenhuma diferença significativa intragrupos foi observada no consumo calórico médio ao longo do experimento. Entretanto, o consumo do grupo iSGLT2 foi maior em relação ao grupo Controle na 1ª semana/S1 (iSGLT2 = $24,00 \pm 6,01$ kcal; Controle = $19,09 \pm 4,99$ kcal) e, na 25ª semana/S25, o grupo submetido ao tratamento combinado pelo exercício físico e iSGLT2 apresentou maior consumo em relação ao grupo exercício (iSGLT2+Exercício = $18,67 \pm 2,10$ kcal; Exercício = $14,81 \pm 3,24$ kcal).

Tabela 8. Consumo calórico diário médio de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental – grupos experimentais.

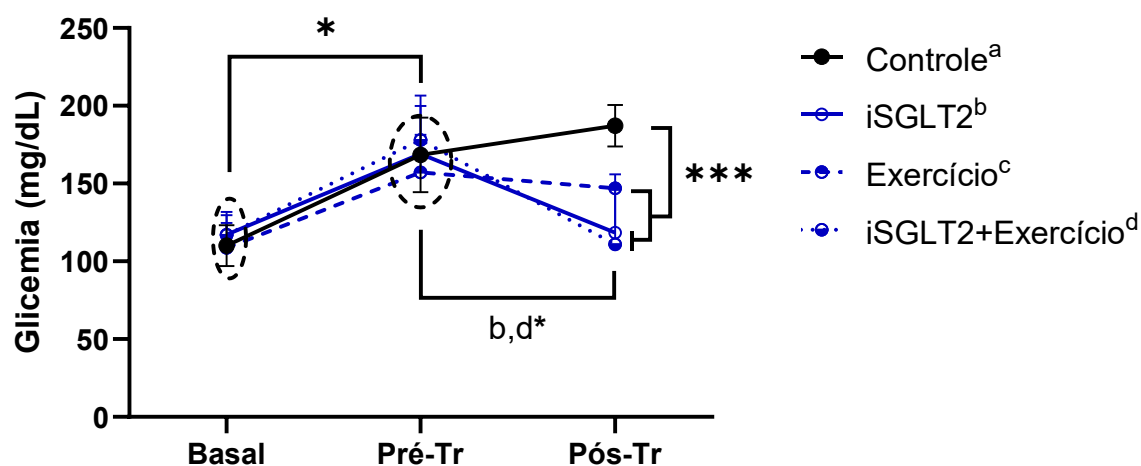
Semanas	Consumo energético (kcal)				Diferença estatística (valor de p)
	Controle ^a	iSGLT2 ^b	Exercício ^c	iSGLT2+ Exercício ^d	-
Basal (S1)	19,09±4,99	24,00±6,01	16,15±2,87	21,58±2,94	^a Vs. ^b (0,04)
S17	15,41±1,72	19,86±0,56	16,87±3,14	18,67±1,01	NS
S25	15,45±1,36	19,14±2,21	14,81±3,24	18,67±2,10	^c Vs. ^d (0,05)
Diferença estatística	NS	NS	NS	NS	-

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão (DP). Foi realizada análise de variância de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas valores menores ou igual a $p=0,05$. S1 = semana 1; S17 = semana 17; S25 = semana 25; kcal = quilocalorias; NS = não significante. Controle, n=11; iSGLT2 (inibidor do cotransportador de sódio-glicose-2), n=7; Exercício n=15; iSGLT2 mais Exercício, n=12.

6.2.3 Glicemia

Em todos os grupos DRDe os níveis de glicemia aumentaram significativamente após a 17^a semana (Pré-Tratamento). Já na 25^a semana (Pós-Tratamento), os grupos iSGLT2 e iSGLT2+Ex apresentaram redução significativa em relação ao período Pré-Tratamento. Tais reduções, somadas àquela verificada no grupo Ex, foram significativamente maiores em relação ao grupo Controle (Figura 12).

Figura 12. Valores de glicose plasmática em animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental – grupos experimentais

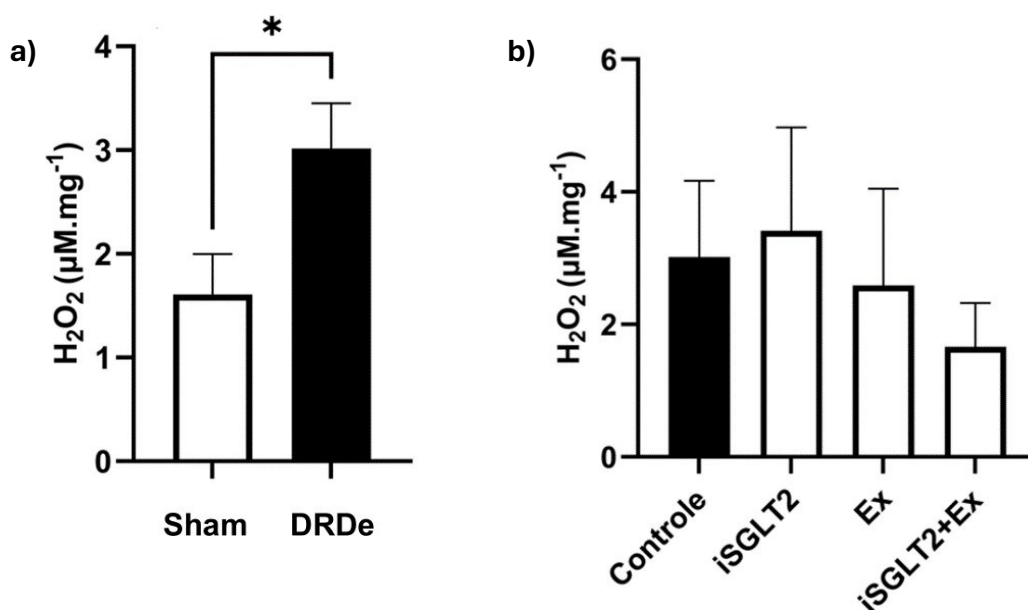


Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP). Análise de variância ANOVA Two-way seguido pelo teste Tukey para comparação de médias. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas com * $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$. Controle (n=11), iSGLT2 (n=7), Exercício (n=11), iSGLT2+Exercício (n=11).

6.2.4 Produção de espécies reativas de oxigênio

Conforme demonstrado na figura 13, os animais expostos a DRDe apresentaram níveis mais elevados de estresse oxidativo quando comparados ao Sham (13a). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados (13b).

Figura 13. Produção de ERO no músculo quadríceps de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.

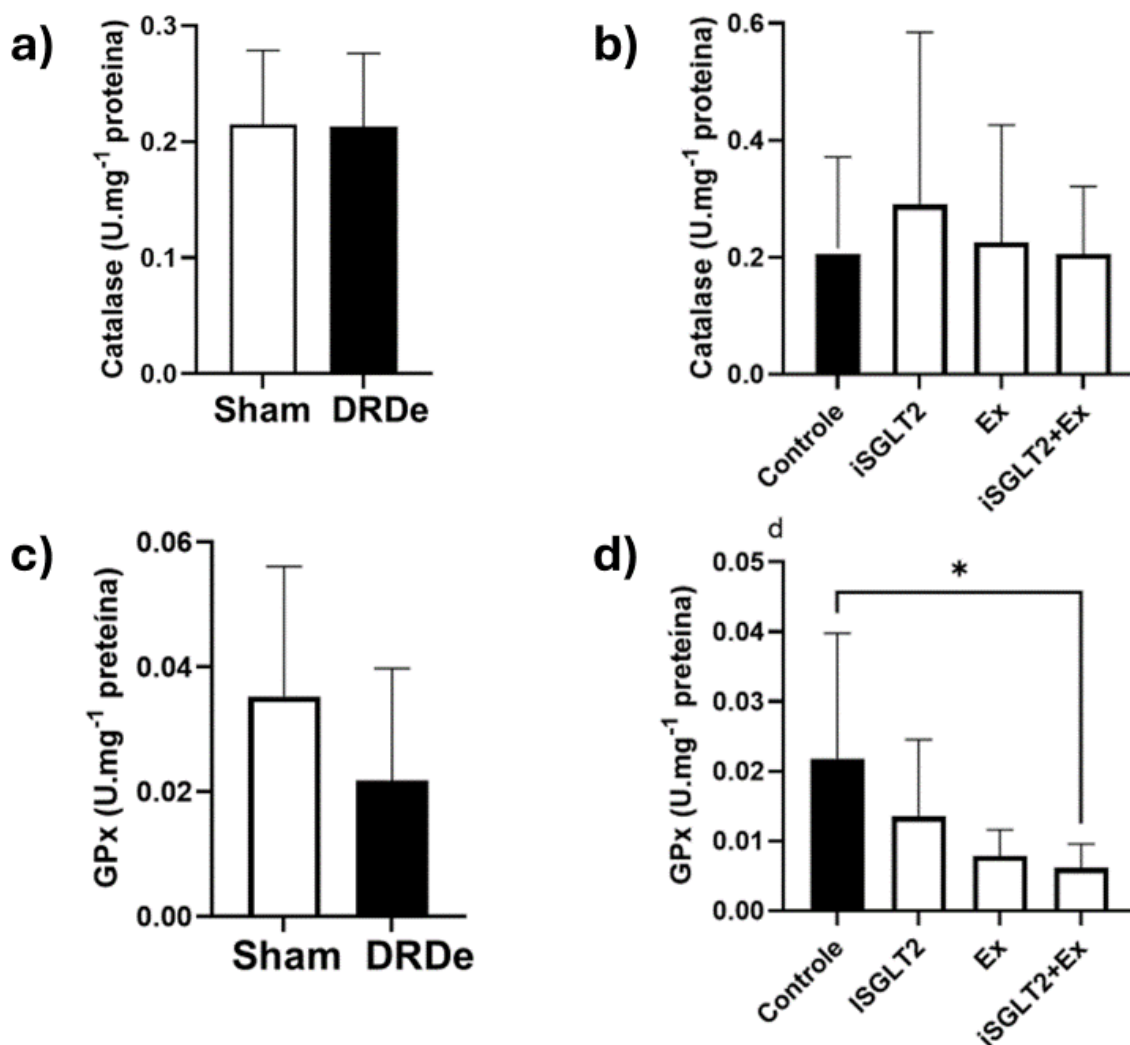


Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão dos grupos Sham (n=7), DRDe (n=7), Controle (n=7), iSGLT2 (n=6), Exercício (n=7), iSGLT2+Exercício (n=7). Para comparação dos dois grupos foi utilizado o teste *t* de *student* e a análise de variância de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para as comparações múltiplas. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas com $*p < 0,05$. ERO – espécies reativas de oxigênio; DRDe = doença renal do diabetes experimental; iSGLT2 = inibidor do cotransportador de sódio-glicose-2; Ex = exercício físico.

6.2.5 Atividade de enzimas antioxidantes

Nenhuma alteração significativa foi observada na atividade antioxidante da CAT e GPx na comparação entre os grupos Sham e DRDe (Figuras 14a e 14c, respectivamente), bem como nos grupos DRDe tratados com o iSGLT2 ou Ex em comparação ao Controle (Figura 14b). Porém, o tratamento conjunto ao qual foi submetido o grupo iSGLT2+Ex resultou em menor atividade da GPx, comparando-o novamente ao grupo Controle (Figura 14d).

Figura 14. Atividade da catalase (a e b) e glutathiona peroxidase (c e d) no músculo quadríceps de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.

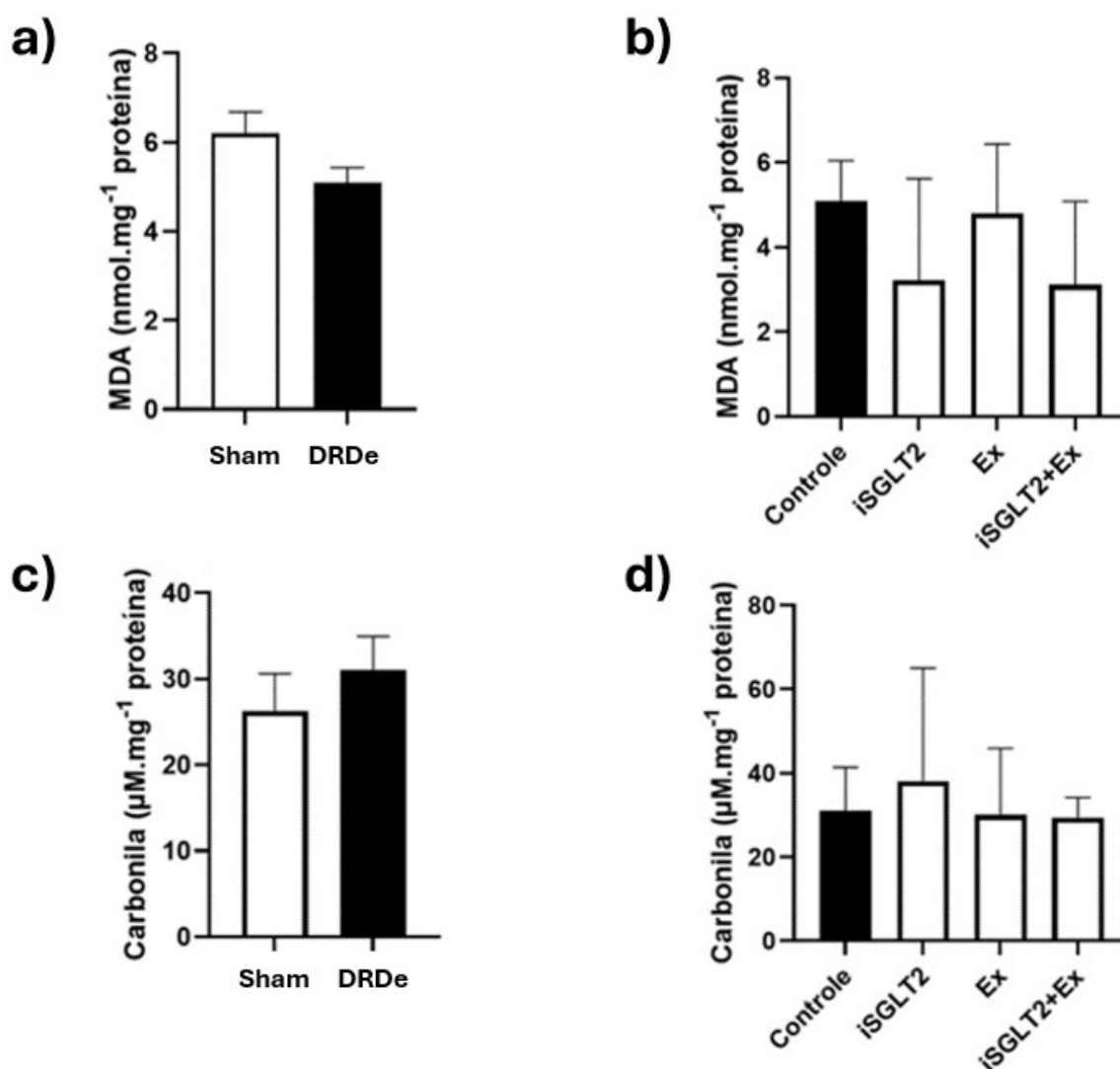


Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão dos grupos Sham (n=6), DRDe (n=6), Controle (n=6), iSGLT2 (n=6), Exercício (n=6), iSGLT2+Exercício (n=6). Para comparação dos dois grupos foi utilizado o teste *t* de *student* e a análise de variância de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para as comparações múltiplas. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas com $*p < 0,05$. DRDe = doença renal do diabetes experimental; GPx = glutathiona peroxidase; iSGLT2 = inibidor do cotransportador sódio-glicose-2; Ex = exercício físico.

6.2.6 Danos oxidativos

Nenhuma alteração significativa foi observada na concentração de MDA e na carbonilação de proteínas (Carbonila) na comparação entre os grupos Sham e DRDe (Figuras 15a e 15c, respectivamente), bem como entre os grupos DRDe e aqueles submetidos aos seus respectivos tratamentos (Figuras 15b e 15d).

Figura 15. Níveis de malondialdeído (a e b) e carbonilação de proteínas (c e d) no músculo quadríceps de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.



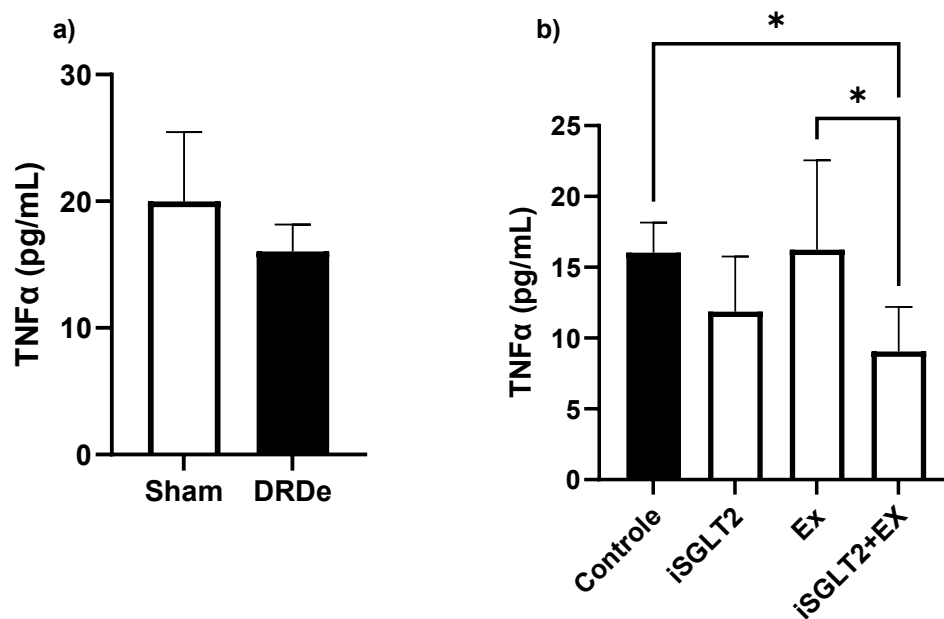
Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão dos grupos Sham (n=6), DRDe (n=6), Controle (n=6), iSGLT2 (n=6), Ex (n=6), iSGLT2+Ex (n=6). Para comparação dos dois grupos foi utilizado o teste *t* de student e a análise de variância de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para as comparações múltiplas. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas com $*p < 0,05$. DRDe = doença renal do diabetes experimental; MDA = malondialdeído; iSGLT2 = inibidor do cotransportador sódio-glicose-2; Ex = exercício físico.

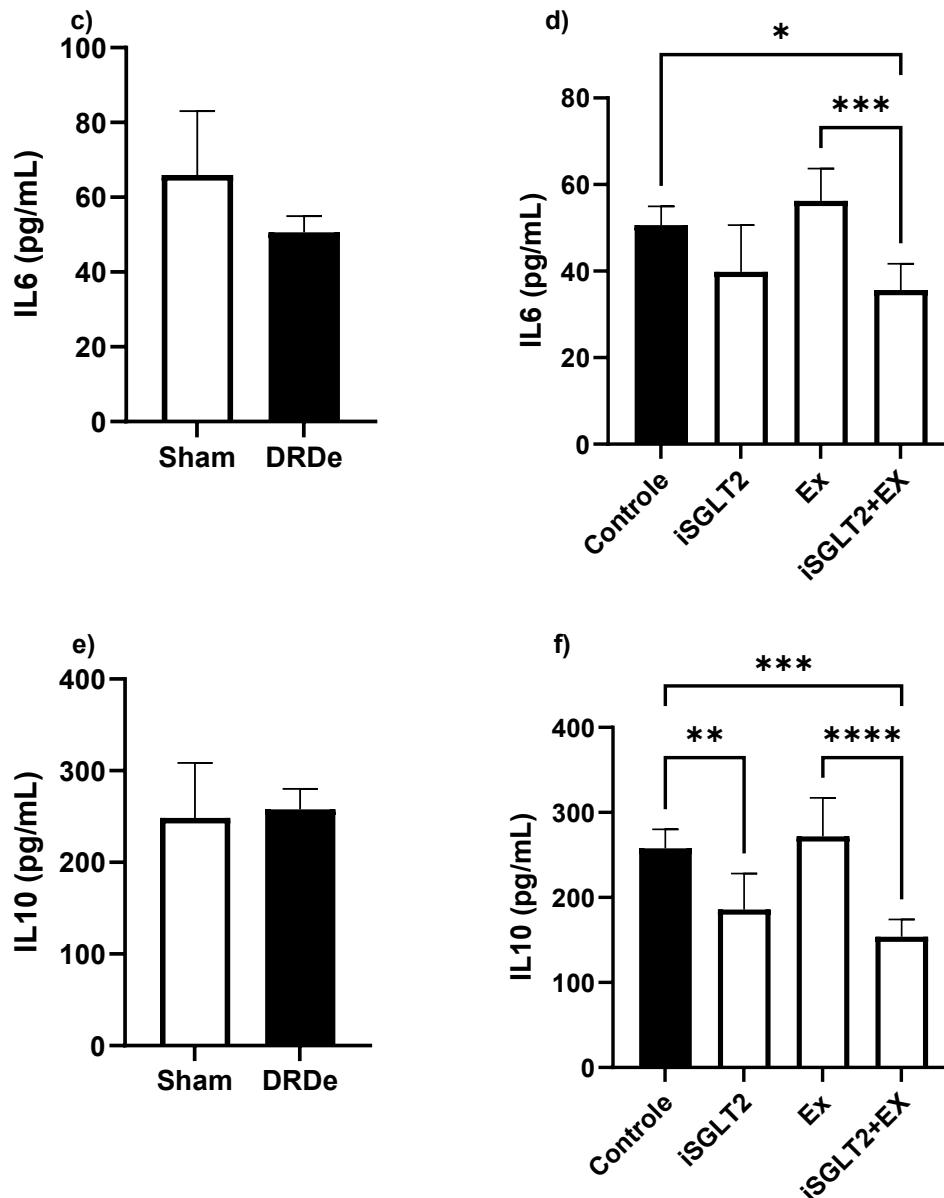
6.2.7 Parâmetros inflamatórios

As análises dos marcadores inflamatórios demonstraram que, na comparação entre os grupos Sham e DRDe, não houve diferença (Figuras 16a, 16c e 16e). Entretanto, o grupo

que recebeu o tratamento combinado apresentou diminuição significativa nos seus índices pró-inflamatórios (TNF α : $p<0,0400$ e $p<0,0337$; IL-6: $p<0,0126$ e $p<0,0007$) quando comparado ao grupo submetido ao protocolo de exercício (Ex) e ao grupo controle (Con), respectivamente (Figuras 16b, 16d). O tratamento combinado, observado no grupo iSGLT2+Ex, também surtiu efeito significativo na diminuição da ação anti-inflamatória (IL-10: $p<0,0002$ e $p<0,0001$) em relação aos grupos Con e Ex, respectivamente. Da mesma forma, o grupo submetido ao medicamento apenas (iSGLT2) obteve níveis significativamente menores (Figura 16f) do que o Con nos índices anti-inflamatórios (IL-10: $p<0,0088$).

Figura 16. Níveis de TNF- α (a, b), IL-6 (c, d) e IL-10 (e, f) no músculo gastrocnêmio de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.





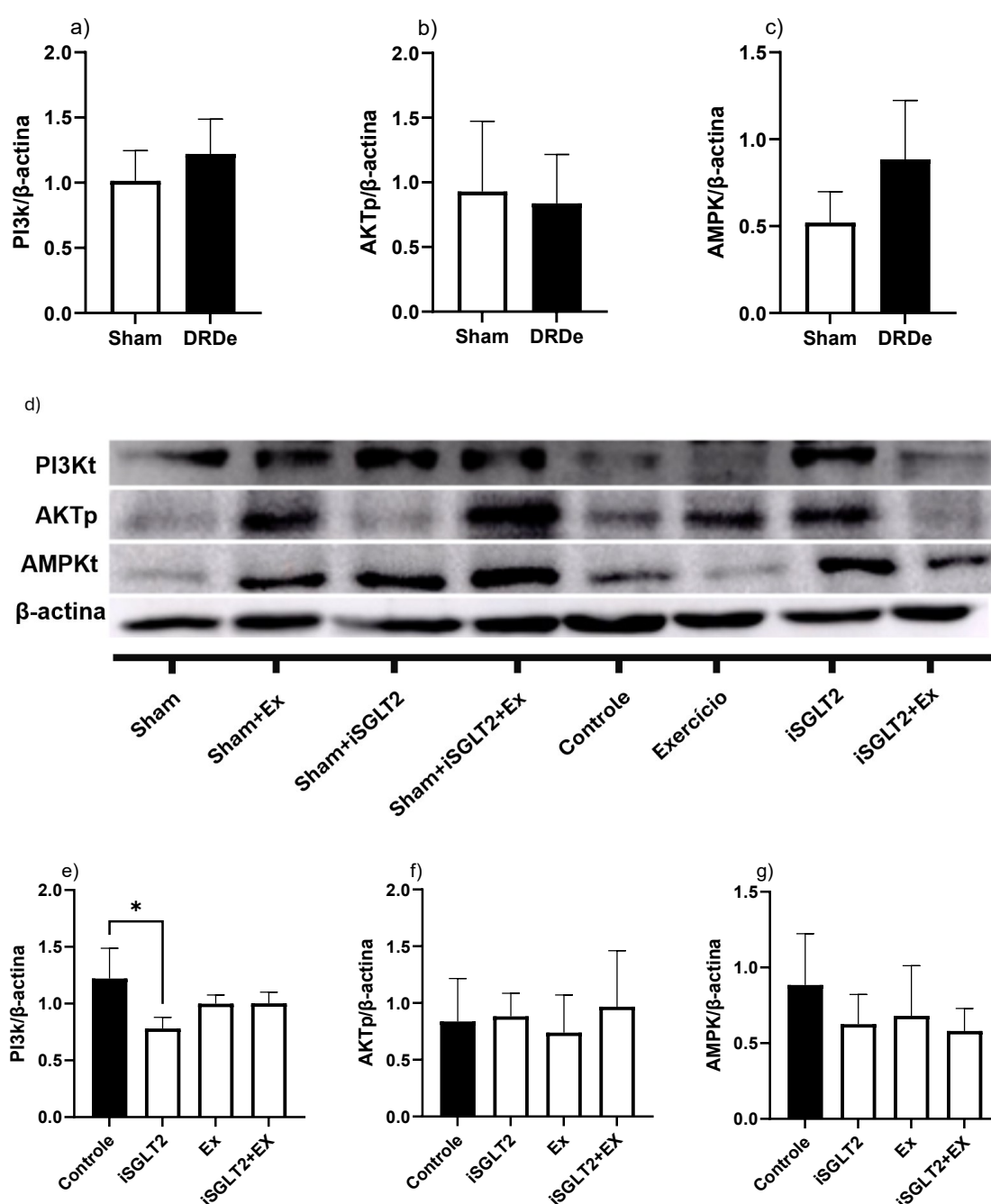
Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão dos grupos Sham (n=6), DRDe (n=6), Controle (n=6), iSGLT2 (n=6), Ex (n=6), iSGLT2+Ex (n=6). Para comparação dos dois grupos foi utilizado o teste t de student e a análise de variância de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para as comparações múltiplas. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas com $*p < 0,05$. DRDe = doença renal do diabetes experimental; TNF-alfa = fator de necrose tumoral alfa; IL-6 = interleucina 6; IL-10 = interleucina 10; iSGLT2 = inibidor do cotransportador sódio-glicose-2; Ex = exercício físico.

6.2.8 Parâmetros metabólicos

Conforme observado na Figura 17, os conteúdos de PI3K, Akt-p e AMPK não foram significativamente alterados pela DRDe (17a, 17b e 17c). Os presentes resultados apontam

que o uso do iSGLT2 reduziu o conteúdo da PI3K (17e). Já as demais proteínas analisadas não sofreram alterações por nenhum dos tratamentos (17f e 17g).

Figura 17. Níveis de PI3K (a, e), Akt-p (b, f) e AMPK (c, g) no músculo sóleo de animais expostos a um modelo de doença renal do diabetes experimental.



Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão dos grupos Sham (n=4); DRDe (n=4); Controle (n=4); iSGLT2 (n=4); Ex (n=4); iSGLT2+Ex (n=4). Para comparação dos dois grupos foi utilizado o teste *t* de *student* e a análise de variância de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para as comparações múltiplas. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas com $*p < 0,05$. DRDe = doença renal do diabetes experimental; iSGLT2 = inibidor do cotransportador sódio-glicose-2; Ex = exercício físico.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou investigar os mecanismos de ação, combinados ou não, entre o exercício físico leve a moderado e a EMP, um inibidor do SGLT2, na regulação do sistema redox, inflamatório e metabólico muscular em camundongos machos C57BL/6J expostos à DRDe. O modelo de indução utilizado no presente estudo foi desenvolvido de acordo com a literatura [135, 136], visando mimetizar a DRD a partir da associação da DHL e STZ, enquanto o programa de exercícios físicos e o uso da EMP como terapias para o tratamento da DRDe foram conduzidos de acordo com estudos prévios que utilizaram essas terapias de forma isolada, diferentemente do que foi investigado neste estudo [21, 89, 113, 114].

Os efeitos da DRDe exercem mudanças sobre os indicadores clínicos e função renal, conforme demonstrado em estudos que relataram a utilização de modelos experimentais similares para reproduzir a fisiopatologia da doença em seres humanos e animais [132-134], permitindo assim a investigação dos mecanismos moleculares e da eficácia de terapias em ambiente controlado. Avaliar esses parâmetros, no presente estudo, foi essencial para reportar não somente a eficiência do modelo proposto, como também confirmar a reprodutibilidade e a consistência dos estudos já realizados, além de permitir explorar novos aspectos terapêuticos e mecanismos de ação no músculo esquelético.

Um importante componente na DRD, a massa corporal pode, ao apresentar valores elevados, contribuir para o surgimento e progressão da doença, promovendo alterações na homeostase metabólica e no sistema imunológico [31, 63, 64]. Essas alterações podem influenciar negativamente a função renal e aumentar o risco de diversas complicações [83]. Nossos resultados mostraram que ambos os grupos, Sham e DRDe, apresentaram massa corporal semelhante no início do estudo. Porém, nos animais do grupo DRDe esse aumento

ocorreu significativamente no decorrer do período experimental, com significativa variação média de elevação na 17ª e 25ª semanas. Esses resultados seguem dados encontrados em estudos prévios [150], como no conduzido por Avtanski e colaboradores (2019), que, ao caracterizar o efeito de um modelo de obesidade na inflamação e RI em camundongos C57BL/6J, observaram elevação de aproximadamente 40% no peso dos animais submetidos a 9 semanas de uma DHL com o mesmo teor de gordura aplicado neste estudo [151].

Outro fator fundamental na mudança da massa corporal é o elevado consumo de alimentos desempenha, uma vez que a ingesta calórica excessiva sem o proporcional gasto energético resulta em acúmulo de gordura corporal e elevação de peso [2, 4]. Este desequilíbrio é um fator chave na obesidade, que está associada a alterações metabólicas e inflamatórias que podem agravar a DRD. Conforme observado na Tabela 6, as análises intragrupos mostram que não houve diferença significativa no consumo calórico dos grupos experimentais no decorrer do estudo e entre os tempos de análises. Entretanto, o consumo calórico do grupo DRDe foi menor em relação ao grupo Sham na 17ª semana e na 25ª semana. Estes resultados estão em concordância com outros achados [152-155]. Ainda que a medição da concentração de leptina não tenha sido realizada neste estudo, existe a possibilidade dessa ter sido a causa da menor ingesta alimentar no grupo DRDe, dado o fato de que a alimentação baseada em uma DHL proporciona maior saciedade e estímulo à liberação de leptina, com consequente redução no consumo alimentar [156-159]. A possível alteração do paladar, quando na introdução da DHL, pode ter sido outro fator a ter influenciado a ingesta alimentar, como relatado em experimentos animais e humanos [160, 161].

Por sua vez, em estudo que analisou o efeito da DHL por apenas 4 semanas em camundongos C57BL/6J, Wilde e colaboradores (2007) também observaram significativa elevação nas concentrações de glicemia [162]. A glicemia é um indicador da saúde

metabólica e tem sido utilizada como parâmetro para avaliar a eficácia e a progressão da obesidade em modelos experimentais de DM que, clinicamente, se evidenciam pelo quadro hiperglicêmico constante [163]. Os níveis de glicemia significativamente elevados no grupo de DRDe, somados àqueles significativamente mais elevados na depuração da glicose observados no GTT, refletem um descontrole glicêmico persistente. Essa modificação na homeostase da glicose ocasiona alterações na sinalização da insulina, o que resulta na diminuição da captação de glicose pelo músculo, alteração da lipogênese e aumento da produção de glicose pelo fígado, conforme a presença ou não da insulina [43]. Esse mecanismo está relacionado a um estado inflamatório crônico e à liberação de ERO [164] que, de forma persistente, podem levar a alterações funcionais e fenotípicas nas células e tecidos renais, resultando em danos glomerulares e tubulares e no aparecimento de doença renal [165]. Visando confirmar essas implicações, valores aumentados de glicosúria e albuminúria foram observados nos animais com DRDe, o que reflete o comprometimento da capacidade renal de reabsorver glicose, disfunção tubular [166] e a deterioração da função renal [167], resultados esses em conformidade com estudos anteriores [168, 169].

O quadro de RI na DRD gera um impacto significativo na homeostase muscular, levando a alterações metabólicas e redução da massa e força musculares, o que resulta na diminuição da qualidade de vida e no aumento do risco de morbidade e mortalidade tanto em animais quanto em humanos [170, 171]. Um dos recursos para minimizar essas decorrências sobre o músculo esquelético é o uso de terapias farmacológicas, como os inibidores do SGLT2, que se encontram no tecido renal. Estudos mostraram que o iSGLT2 promove melhorias na saúde metabólica e na função muscular em modelos experimentais de DM [113, 114, 116-119]. Por sua vez, a prática de exercícios físicos é outra estratégia comprovadamente eficaz para melhorar a resposta muscular a DRD, aumentando a captação de glicose pelo músculo e elevando a sensibilidade à insulina [21, 23, 89]. Esses efeitos,

como resposta à utilização do exercício físico e iSGLT2, podem levar a uma melhor regulação glicêmica e atenuar os impactos negativos da DRD.

Inicialmente, os resultados dos indicadores clínicos estão alinhados com estudos que utilizaram modelos experimentais de DRD [172, 173]. As reduções significativas do peso corporal observadas na 25ª semana, nos animais submetidos ao exercício, corroboram com outros estudos [152, 174], enquanto essa perda também foi observada de maneira significativa no peso dos animais submetidos ao tratamento combinado (iSGLT2+Ex). Por exemplo, Linden e colaboradores (2019) buscaram analisar o papel dos tratamentos de 12 semanas, combinados ou não, no controle glicêmico em ratos Sprague Dawley induzidos à obesidade e consequente T2DM via DHL (45% gordura, 23,77% proteína, 31,23% carboidrato) e STZ (30mg/kg). Os resultados encontrados foram de breve aumento de peso no grupo submetido ao medicamento e de diminuição de peso corporal no grupo submetido a ambos Ex e iSGLT2, assim como nos dados aqui apresentados [175].

Os resultados apresentados na Tabela 8 indicam que, embora não tenha havido diferença significativa intragrupos no consumo calórico médio ao longo do experimento, importantes diferenças entre os grupos foram observadas em pontos específicos. Na 1ª semana, o grupo tratado com iSGLT2 apresentou maior consumo calórico em comparação ao grupo DRDe, o que acreditamos estar relacionado ao aumento na excreção de glicose promovido pelo medicamento, levando a uma maior ingestão calórica como mecanismo compensatório da perda energética. Na 25ª semana, o grupo submetido a ambos os tratamentos, ~~através~~ do exercício físico com o uso do iSGLT2, também demonstrou consumo calórico significativamente maior em relação ao grupo que realizou apenas o exercício, o que pode refletir um efeito sinérgico entre as intervenções na modulação do gasto energético e do apetite. Não foram encontrados estudos prévios que possam reforçar tais possibilidades.

A diminuição nos níveis de glicemia nos grupos DRDe que foram tratados com o iSGLT2 e o exercício, após 25 semanas, reforça achados anteriormente publicados [173-175]. Esses efeitos, embora não potencializados pela associação de ambos os tratamentos, decorrem possivelmente da capacidade que o iSGLT2 e o exercício possuem em modular os níveis glicêmicos por mecanismos distintos. Estudos anteriores revelaram que o exercício físico melhora a captação da glicose pelos músculos a partir do aumento na expressão de transportadores de glicose, como o GLUT4, na membrana celular, independente da ação da insulina [25, 176]. Esse mecanismo facilita a entrada da glicose nas células musculares, reduzindo sua concentração plasmática. Além disso, o exercício eleva a sensibilidade à insulina, o que potencializa ainda mais a redução da glicemia [86, 177]. Em recente estudo publicado por Saberi e colaboradores (2024), 28 ratos Wistar foram induzidos à obesidade e DRD via DHL e tratados com uma rotina de exercício intervalados de alta intensidade – HIIT. Apesar da diferença no modelo de exercício físico, os achados referentes aos patamares glicêmicos, ainda que com valores mais elevados, seguiram padrão similar ao observado pelo presente estudo, com significativa queda como resultado do exercício [173].

Por outro lado, o iSGLT2 reduz a glicemia ao bloquear a reabsorção da glicose nos túbulos renais, promovendo a sua excreção através da urina por meio de um mecanismo não-dependente da insulina [122, 123]. Conforme os resultados obtidos neste estudo, esse mecanismo foi mais efetivo que o exercício físico, indo ao encontro do estudo de Steven e colaboradores (2017), que demonstraram a efetividade do uso do iSGLT2 nas complicações primárias do DM em roedores através da restauração do controle glicêmico, da melhora da função endotelial e da redução do estresse oxidativo, além de observarem a prevenção epigenética da glucotoxicidade e da inflamação pelo uso do medicamento [111].

Cabe destacar que a ausência dos efeitos combinados entre o exercício físico e o uso do iSGLT2 na diminuição dos níveis glicêmicos notada em nosso estudo foi observada em

achados anteriores, ainda que com seres humanos. Por exemplo, Newman e colaboradores (2019) relataram que o uso diário da dapagliflozina em 30 homens obesos e sedentários, após 12 semanas de treinamento de endurance supervisionado, além de não promover efeitos sinérgicos, anulou o efeito benéfico do exercício de endurance na sensibilidade à insulina, independentemente das melhorias observadas na aptidão aeróbia ou na composição corporal dos participantes [178]. Esses resultados sugerem que, embora ambas as intervenções sejam eficazes na modulação dos valores glicêmicos de forma individual, a sua combinação pode não oferecer benefício adicional no controle da glicemia em humanos.

Na DRD, alterações redox musculares são impulsionadas por uma combinação de fatores que podem levar a reações recíprocas. A hiperglicemia crônica leva à produção excessiva de ERO por meio de várias vias metabólicas, como a glicação avançada de proteínas [179] e a disfunção mitocondrial [180]. A RI também contribui para o desequilíbrio redox, ao reduzir a captação de glicose pelo músculo e alterar o metabolismo energético [181]. Além disso, a inflamação crônica de baixo grau persistente em modelos de DRD ativa vias inflamatórias que aumentam a produção de ERO no músculo esquelético [182]. Esses fatores combinados não apenas prejudicam a função muscular, mas também aceleram a progressão da DRD. Neste sentido, considerando que o músculo esquelético é sensível a mudanças redox induzidas pela DRD, mensuramos alguns marcadores de estresse oxidativo para avaliar o impacto do exercício físico e do uso do iSGLT2 na modulação desses parâmetros.

O significativo aumento das concentrações de H_2O_2 muscular nos animais DRDe, observado neste estudo, revela uma produção suprafisiológica muscular de H_2O_2 sob as condições experimentais utilizadas nesse projeto. O H_2O_2 desempenha um papel duplo na musculatura esquelética, agindo tanto como molécula sinalizadora que facilita adaptações funcionais à atividade contrátil, quanto agente potencialmente danoso ao tecido muscular

[183]. Em níveis fisiológicos, o H_2O_2 participa da regulação de diversas funções celulares, incluindo a sinalização da insulina, a ativação de fatores de crescimento e a regulação redox [184]. No entanto, a produção excessiva de H_2O_2 , além de provocar o estresse oxidativo, pode resultar em prejuízo na sinalização da insulina e consequente redução na atividade dos transportadores de glicose, potencializando a deterioração da função muscular e acelerando a progressão da doença [185]. Embora o modelo experimental de DRD não tenha resultado em um aumento nos níveis de interleucinas inflamatórias musculares que justificasse a inflamação como principal indutora dos patamares elevados de H_2O_2 muscular, faz-se importante considerar outros mecanismos que possam estar presentes e que justifiquem a elevação observada em nossos resultados, superando as capacidades antioxidante e anti-inflamatória esperadas do exercício físico e do iSGLT2. Por exemplo, a combinação de uma DHL associada a STZ pode promover estresse metabólico via glicotoxicidade e lipotoxicidade [186], o que leva a disfunção mitocondrial e aumento da produção de ânion superóxido [153]. Essas condições favorecem a geração de H_2O_2 , independentemente da presença de uma resposta inflamatória.

O aumento na produção de H_2O_2 muscular nos animais com DRDe não resultou em elevação nos indicadores de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas. Esses resultados podem estar relacionados à ativação de mecanismos antioxidantes compensatórios não analisados nesse estudo, mas que protegem a célula muscular contra danos oxidativos, como a atividade de peroxirredoxinas e tiorredoxinas, uma vez que a atividade da catalase e da GPx também não apresentaram alterações significativas. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que as mitocôndrias, principais fontes de ERO, não possuem quantidades significativas de catalase e as peroxinas são muito mais abundantes que a GPx, o que faz com que a maior parte do H_2O_2 seja principalmente catalisada pelo sistema peroxina/tiorredoxina [187].

Outro fato a ser considerado é que o H_2O_2 pode ser metabolizado pela mieloperoxidase (MPO). A MPO é uma enzima que utiliza o H_2O_2 para gerar ácido hipocloroso, um agente microbicida potente que também pode exercer efeitos citotóxicos e contribuir para a inflamação e danos teciduais [188]. Na DRD, a atividade da MPO é aumentada, contribuindo para o estresse oxidativo e inflamatório crônico [189] e desviando o H_2O_2 da reação de Fenton, que normalmente geraria mais espécies reativas, como o radical hidroxila. Portanto, é possível que o H_2O_2 possa ser consumido pela MPO antes que venha a causar lipoperoxidação ou carbonilação de proteínas expressivas.

A ausência de efeitos significativos causados pelo exercício físico e pelo iSGLT2 no conteúdo de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas sugere que, embora ambas as intervenções causem melhoras em outros aspectos do metabolismo celular, elas podem não impactar diretamente a atividade da MPO ou de vias específicas de desvio do H_2O_2 , limitando sua ação sobre danos oxidativos em músculos no contexto da DRD. Por outro lado, a possível ação conjunta entre iSGLT2 e exercício na modulação do sistema antioxidante promoveu menor atividade da GPx, cuja diminuição no músculo de animais com DRD e tratados com o exercício físico e o iSGLT2, em comparação com aqueles animais expostos a DRD sem tratamento (Controle = Con), pode ser atribuída à redução do estresse oxidativo global, resultado das melhorias no controle glicêmico e nas funções metabólicas promovidas pelos tratamentos, como já relatado em estudos prévios [176, 190, 191]. Este mecanismo adaptativo sugere a redistribuição das defesas antioxidantes em resposta a um ambiente celular com menor estresse oxidativo, mantendo a integridade muscular sem necessidade de alta atividade da GPx.

No modelo experimental de DRD induzido pela DHL e STZ, a inflamação muscular é um processo esperado, em razão do estresse metabólico e oxidativo causado pela obesidade [153]. Normalmente, a DRD está associada a um aumento na produção de

citocinas pró-inflamatórias que podem causar RI no músculo esquelético [106]. Entretanto, nossos resultados mostraram que o modelo experimental não promoveu alterações significativas nas concentrações musculares de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, e anti-inflamatórias, como a IL-10. Cabe observar que a resposta inflamatória no tecido muscular pode ser modulada de maneira diferente em relação a outros tecidos, como o adiposo ou renal, devido à atividade dos receptores inflamatórios ou à presença de mecanismos compensatórios que limitam a inflamação local. Tal argumento foi comprovado por Saberi e colaboradores (2024), que recentemente revelaram que os modelos de DRDe aumentam os níveis musculares de interleucinas pró-inflamatórias [176]. Nossos resultados contrariam estudos prévios que demonstraram a elevação das concentrações de interleucinas em músculos de ratos/camundongos devido à utilização da DHL isoladamente ou em associação com a STZ [192-194]. A variabilidade genética entre diferentes linhagens e o estado metabólico dos animais podem ser variáveis que justificam os resultados distintos daqueles encontrados em estudos anteriores. É também possível que o músculo tenha desenvolvido mecanismos adaptativos ao longo do tempo, reduzindo o impacto inflamatório esperado nesse modelo experimental.

Apesar de não haver diferenças na expressão inflamatória muscular nos animais com DRDe, nossos resultados mostraram diminuição significativa nos teores de TNF- α , IL-6 e IL-10 no grupo iSGLT2+Ex comparado ao grupo Controle. Estes resultados estão em conformidade com os estudos CANVAS [195] e DECLARE-TIMI [196], que avaliaram o efeito da canagliflozina e dapagliflozina, respectivamente, em pacientes com T2DM e alto risco cardiovascular. O exercício físico é conhecido por sua capacidade de atenuar a inflamação sistêmica e local, promovendo a liberação de miocinas anti-inflamatórias e melhorando a sensibilidade à insulina [197], o que pode reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e a TNF- α . Por outro lado, os iSGLT2 também possuem efeitos

anti-inflamatórios indiretos ao diminuir a glicotoxicidade e a ativação de vias inflamatórias associadas ao excesso de glicose [198].

O músculo esquelético atua na regulação da glicemia durante o exercício, promovendo a captação de glicose através de mecanismos que envolvem vias de sinalização específicas. Durante o exercício físico, a ativação do eixo PI3K-Akt promove a translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a membrana celular, facilitando a captação da glicose. O exercício também estimula a fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que realiza a captação de glicose pela translocação do GLUT4 independentemente da insulina [53]. Várias evidências prévias têm mostrado que essas vias de sinalização são prejudicadas na DRD [199-201]. Nenhuma alteração significativa foi observada no conteúdo muscular de PI3K, Akt e AMPK em animais com DRDe. A manutenção dos níveis similares ao grupo Controle pode estar associada a uma regulação compensatória, embora doenças renais crônicas sejam conhecidas por afetar a sinalização dessas vias [202]. O fato de que o exercício físico, isolado ou em combinação com o iSGLT2, não alterou a expressão dessas proteínas sugere que os efeitos benéficos dessas intervenções podem ser mediados por outras vias através da modulação da atividade dessas mesmas proteínas, e não por mudanças em sua expressão total como já foi previamente observado em estudos anteriores com animais diabéticos [153, 193]. É possível que a ação do exercício e do iSGLT2 atue mais na ativação funcional dessas vias, promovendo a fosforilação e a translocação de GLUT4 sem necessariamente alterar o conteúdo proteico basal, o que poderia explicar a manutenção dos níveis dessas proteínas mesmo sob intervenções terapêuticas. Ainda que tenha sido observada redução do conteúdo da PI3K através do tratamento com o medicamento no presente estudo, a ausência de alterações apresentada no grupo DRDe pode se dar como resposta a uma possível adaptação compensatória do organismo, na qual obesidade e o T2DM são capazes de induzir tal mecanismo, preservando a função dessas

proteínas, ou mesmo em consequência da variabilidade individual dos músculos e animais na resposta ao protocolo experimental, mascarando diferenças significativas no grupo DRDe como um todo. A redução da PI3K como resposta ao tratamento isolado do medicamento, por sua vez, possivelmente deu-se como reflexo da capacidade da EMP em melhorar ou como reflexo da melhora da sensibilidade à insulina [203] e reduzir o quadro inflamatório renal [204], diminuindo assim a sinalização da PI3K em uma cascata de eventos que diminui a necessidade da sua ativação para que a captação da glicose ocorra.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo investigou os efeitos da empagliflozina e do exercício físico de intensidade leve e moderada na progressão da doença renal do diabetes em camundongos C57BL/6J obesos e diabéticos, com o intuito de determinar se essas intervenções poderiam reduzir a gravidade da doença renal e seus mecanismos subjacentes. A dieta hiperlipídica, em associação ao medicamento, causou obesidade e diabetes nos camundongos do grupo DRDe, com aumento significativo da glicemia, glicosúria, albuminúria e disfunção renal. O tratamento medicamentoso dado aos camundongos diabéticos obesos (grupo iSGLT2) reduziu a glicosúria, a proteinúria e a disfunção renal. O iSGLT2 também diminuiu a expressão da proteína PI3K no tecido muscular, além de reduzir os níveis de IL-10. O exercício físico imposto aos camundongos diabéticos obesos (grupo Ex) reduziu a glicemia, a glicosúria e a proteinúria, mas não teve efeito significativo na disfunção renal. O exercício físico também não alterou a expressão das proteínas PI3K, Akt-p e AMPK no tecido muscular. A sinergia resultante da associação dos tratamentos pode ser observada no grupo submetido a ambos – medicamento e exercício (iSGLT2+Ex) –, que apresentou os melhores resultados por meio da redução da glicemia, glicosúria, albuminúria e da disfunção renal. Houve ainda, no mesmo grupo, redução nos medidores inflamatórios do tecido muscular. Além disso, após a instalação do estado inflamatório crônico da DRD como consequência da associação entre a DHL e a STZ, os tratamentos impediram a evolução da doença e a instalação de um quadro ainda mais grave, atuando como agente quimioprotetor do organismo.

Estes resultados sugerem que o iSGLT2 e o exercício físico podem ser intervenções promissoras para o tratamento da doença renal do diabetes em camundongos obesos e diabéticos. Pesquisas são necessárias para confirmar esses resultados em humanos e para elucidar completamente os mecanismos subjacentes pelos quais essas intervenções atuam.

8.1 LIMITAÇÕES

Alguns aspectos metodológicos trouxeram limitação para a execução e obtenção dos resultados aqui apresentados. Dentre eles, o número final de animais obtido, que impossibilitou a realização de algumas análises e consequente melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nos tratamentos. Outro fator limitante foi a necessidade de se adaptar alguns procedimentos em virtude da pandemia de Covid-19, que perdurou durante a realização da parte experimental do estudo e comprometeu, inclusive, os recursos humanos destinados à sua execução.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro dos resultados obtidos neste estudo, recomenda-se a realização de estudos com maior duração para avaliar os efeitos a longo prazo do iSGLT2, do exercício físico e da combinação de ambos na doença renal do diabetes. Sugere-se também a utilização de diferentes doses de iSGLT2, intensidades e modalidades de exercício, separada e conjuntamente, para determinar os regimes mais eficazes para o tratamento da doença. Finalmente, propõe-se uma investigação mais profunda sobre as alterações das proteínas que controlam o metabolismo da glicose, bem como de outras vias de sinalização que possam estar envolvidas na doença renal do diabetes, em diferentes subgrupos celulares do tecido muscular.

10 REFERÊNCIAS

1. Okunogbe A, Nugent R, Spencer G, Ralston J, Wilding J. Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for eight countries. *BMJ Glob Health*. 2021 Oct;6(10): e006351. doi: 10.1136/bmjgh-2021-006351. PMID: 34737167; PMCID: PMC8487190.
2. WHO Obesity and Overweight 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
3. Pati S, Irfan W, Jameel A, Ahmed S, Shahid, RK. Obesity and Cancer: A Current Overview of Epidemiology, Pathogenesis, Outcomes, and Management. *Cancers* 2023, 15, 485. <https://doi.org/10.3390/cancers15020485>.
4. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2024 Mar 16;403(10431):1027-1050. doi: 10.1016/S0140-6736(23)02750-2. Epub 2024 Feb 29. PMID: 38432237; PMCID: PMC7615769.
5. Abdullah A, Peeters A, de Courten M, Stoelwinder J. The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Sep;89(3):309-19. doi: 10.1016/j.diabres.2010.04.012. Epub 2010 May 20. PMID: 20493574.
6. Magkos F, Hjorth MF, Astrup A. Diet and exercise in the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2020 Oct;16(10):545-555. doi: 10.1038/s41574-020-0381-5. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32690918.
7. Bhaskaran K, Douglas I, Forbes H, dos-Santos-Silva I, Leon DA, Smeeth L. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: A population-based cohort study of 524

- million UK adults. *Lancet*. 2014; 384:755–765. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60892-8.
8. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. World Cancer Report Cancer Research for Cancer Prevention. International Agency for Research on Cancer (IARC) [(acessado em 2 de novembro de 2023)]. Disponível em: https://www.iarc.who.int/cards_page/world-cancer-report/.
 9. Hoogeveen EK. The Epidemiology of Diabetic Kidney Disease. *Kidney and Dialysis*. 2022; 2(3):433-442. <https://doi.org/10.3390/kidneydial2030038>
 10. Poloni JAT, Rotta LN. Diabetic kidney disease: pathophysiological changes and urinalysis contribution to diagnosis—a narrative review. *J Lab Precis Med* 2022;7:3 | <https://dx.doi.org/10.21037/jlpm-21-20>.
 11. Tonneijck L, Muskiet MH, Smits MM, van Bommel EJ, Heerspink HJ, van Raalte DH, Joles JA. Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Apr;28(4):1023-1039. doi: 10.1681/ASN.2016060666. Epub 2017 Jan 31. PMID: 28143897; PMCID: PMC5373460.
 12. Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, Neuen BL, Perkovic V. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2021 Aug 28;398(10302):786-802. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00519-5. Epub 2021 Jun 24. PMID: 34175022.
 13. Young CF, Farnoudi N, Chen J, Shubrook JH. Exploring SGLT-2 Inhibitors: Benefits beyond the Glucose-Lowering Effect—What Is New in 2023? *Endocrines* 2023, 4, 630-655. <https://doi.org/10.3390/endocrines4030045>.
 14. Hasan I, Rashid T, Jaikaransingh V, Heilig C, Abdel-Rahman EM, Awad AS. SGLT2 inhibitors: Beyond glycemic control. *J Clin Transl Endocrinol*. 2024 Mar

- 12;35:100335. doi: 10.1016/j.jcte.2024.100335. PMID: 38525377; PMCID: PMC10957445.
15. Luna-Marco C, Iannantuoni F, Hermo-Argibay A, Devos D, Salazar JD, Víctor VM, Rovira-Llopis S. Cardiovascular benefits of SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists through effects on mitochondrial function and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2024 Mar;213:19-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.01.015. Epub 2024 Jan 12. PMID: 38220031.
 16. Saisho Y. SGLT2 Inhibitors: the Star in the Treatment of Type 2 Diabetes? *Diseases*. 2020 May 11;8(2):14. doi: 10.3390/diseases8020014. PMID: 32403420; PMCID: PMC7349723.
 17. Salah HM, Al'Aref SJ, Khan MS, Al-Hawwas M, Vallurupalli S, Mehta JL, Mounsey JP, Greene SJ, McGuire DK, Lopes RD, Fudim M. Effects of sodium-glucose cotransporter 1 and 2 inhibitors on cardiovascular and kidney outcomes in type 2 diabetes: A meta-analysis update. *Am Heart J*. 2021 Mar;233:86-91. doi: 10.1016/j.ahj.2020.12.007. Epub 2020 Dec 29. PMID: 33385359.
 18. Kang A, Jardine MJ. SGLT2 inhibitors may offer benefit beyond diabetes. *Nat Rev Nephrol*. 2021 Feb;17(2):83-84. doi: 10.1038/s41581-020-00391-2. PMID: 33361782. Hasan I, Rashid T, Jaikaransingh V, Heilig C, Abdel-Rahman EM, Awad AS. SGLT2 inhibitors: Beyond glycemic control. *J Clin Transl Endocrinol*. 2024 Mar 12;35:100335. doi: 10.1016/j.jcte.2024.100335. PMID: 38525377; PMCID: PMC10957445.
 19. Formigari GP, Dátalo MN, Vareda B, Bonfante ILP, Cavaglieri CR, Lopes de Faria JM, Lopes de Faria JB. Renal protection induced by physical exercise may be mediated by the irisin/AMPK axis in diabetic nephropathy. *Sci Rep*. 2022 May 31;12(1):9062. doi: 10.1038/s41598-022-13054-y. PMID: 35641586; PMCID: PMC9156698.

20. Bishop NC, Burton JO, Graham-Brown MPM, Stensel DJ, Viana JL, Watson EL. Exercise and chronic kidney disease: potential mechanisms underlying the physiological benefits. *Nat Rev Nephrol.* 2023 Apr;19(4):244-256. doi: 10.1038/s41581-022-00675-9. Epub 2023 Jan 17. PMID: 36650232.
21. Nataraj M, Maiya GA, Nagaraju SP, Shastry BA, Shivashankara KN, Shetty S, Mayya SS. Effect of exercise-based rehabilitation on functional capacity and renal function in type 2 diabetes mellitus with nephropathy: a randomized controlled trial. *Int Urol Nephrol.* 2024 Mar 14. doi: 10.1007/s11255-024-03987-w. Epub ahead of print. PMID: 38483735.
22. Shi K, Zhu Y, Lv J, Sun D, Pei P, Du H, Chen Y, Yang L, Han B, Stevens R, Chen J, Chen Z, Li L, Yu C; China Kadoorie Biobank collaborative group. Association of physical activity with risk of chronic kidney disease in China: A population-based cohort study. *J Sport Health Sci.* 2024 Mar;13(2):204-211. doi: 10.1016/j.jshs.2023.07.004. Epub 2023 Jul 31. PMID: 37532222; PMCID: PMC10980896.
23. Baker LA, March DS, Wilkinson TJ, Billany RE, Bishop NC, Castle EM, Chilcot J, Davies MD, Graham-Brown MPM, Greenwood SA, Junglee NA, Kanavaki AM, Lightfoot CJ, Macdonald JH, Rossetti GMK, Smith AC, Burton JO. Clinical practice guideline exercise and lifestyle in chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2022 Feb 22;23(1):75. doi: 10.1186/s12882-021-02618-1. PMID: 35193515; PMCID: PMC8862368.
24. Wang LR, Baek SS. Treadmill exercise activates PI3K/Akt signaling pathway leading to GSK-3 β inhibition in the social isolated rat pups. *J Exerc Rehabil.* 2018 Feb 26;14(1):4-9. doi: 10.12965/jer.1836054.027. PMID: 29511646; PMCID: PMC5833967.

25. Nadi M, Banaeifar A, Arshadi A. (2021). Effect of an Aerobic Exercise Course on PI3K and AKT1 Expression and Neural Muscle Insulin Resistance in Diabetic Rats. IRANIAN JOURNAL OF DIABETES AND OBESITY, 13(3), 160-165. SID. <https://sid.ir/paper/666978/en>.
26. Jun L, Robinson M, Geetha T, Broderick TL, Babu JR. Prevalence and Mechanisms of Skeletal Muscle Atrophy in Metabolic Conditions. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 3;24(3):2973. doi: 10.3390/ijms24032973. PMID: 36769296; PMCID: PMC9917738.
27. Brown LA, Lee DE, Patton JF, Perry RA Jr, Brown JL, Baum JJ, Smith-Blair N, Greene NP, Washington TA. Diet-induced obesity alters anabolic signalling in mice at the onset of skeletal muscle regeneration. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015 Sep;215(1):46-57. doi: 10.1111/apha.12537. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26052759.
28. Lim C, Nunes EA, Currier BS, McLeod JC, Thomas ACQ, Phillips SM. An Evidence-Based Narrative Review of Mechanisms of Resistance Exercise-Induced Human Skeletal Muscle Hypertrophy. *Med Sci Sports Exerc*. 2022 Sep 1;54(9):1546-1559. doi: 10.1249/MSS.0000000000002929. Epub 2022 Apr 6. PMID: 35389932; PMCID: PMC9390238.
29. Ashcroft SP, Stocks B, Egan B, Zierath JR. Exercise induces tissue-specific adaptations to enhance cardiometabolic health. *Cell Metab*. 2024 Feb 6;36(2):278-300. doi: 10.1016/j.cmet.2023.12.008. Epub 2024 Jan 5. PMID: 38183980.
30. Li RY, Guo L. Exercise in Diabetic Nephropathy: Protective Effects and Molecular Mechanism. *Int J Mol Sci*. 2024 Mar 23;25(7):3605. doi: 10.3390/ijms25073605. PMID: 38612417; PMCID: PMC11012151.
31. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Sep 6;12:706978. doi: 10.3389/fendo.2021.706978. PMID: 34552557; PMCID: PMC8450866.

32. Phelps, N. H., Singleton, R. K., Zhou, B., Heap, R. A., Mishra, A., Bennett, J. E., Paciorek, C. J., Lhoste, V. P., Carrillo-Larco, R. M., Stevens, G. A., Rodriguez-Martinez, A., Bixby, H., Bentham, J., di Cesare, M., Danaei, G., Rayner, A. W., Barradas-Pires, A., Cowan, M. J., Savin, S., ... Ezzati, M. (2024). Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*, 403(10431), 1027–1050. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02750-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02750-2)
33. World Health Organization. Obesity Overview. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/6-facts-on-obesity#:~:text=Obesity%20has%20reached%20epidemic%20proportions,of%20being%20overweight%20or%20obese>.
34. Migowski A, da Costa GTL. Análise Temporal da Prevalência da Obesidade e do Sobrepeso no Brasil Entre 2006 e 2023: Evidências a Partir dos Dados do Vigitel. Revista oficial do programa de pós-graduação stricto sensu do Instituto Nacional de Cardiologia – INC. Vol. 02, n.1(jan-jun), e00104, 2024. <https://doi: 10.33634/2764-0736.2023.0104>.
35. Oliveira ACRD, Nilson EAF, Costa MGD, Barbosa RBDC, Honório OS. Estimate of the prevalence of childhood and adolescent obesity in Brazil from 2024 to 2044. International Congress of Obesity 2024. Acessado em 26/06/2024: <https://zandaeventos.com.br/ico2024/trabalhos/aprovados.php#menuanais>.
36. Nilson EAF, Camargo JM, Rezende LFM. Incident cases and deaths attributable to overweight and obesity in Brasil until 2024. International Congress of Obesity 2024. Acessado em 26/06/2024: <https://zandaeventos.com.br/ico2024/trabalhos/aprovados.php#menuanais>.

37. Simmons, R. A. Cell Glucose Transport and Glucose Handling During Fetal and Neonatal Development. *Fetal and Neonatal Physiology*. 2017. 428–435.e3. [doi:10.1016/b978-0-323-35214-7.00043-3](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35214-7.00043-3).
38. Lizák B, Szarka A, Kim Y, Choi KS, Németh CE, Marcolongo P, Benedetti A, Bánhegyi G, Margittai É. Glucose Transport and Transporters in the Endomembranes. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 24;20(23):5898. doi: 10.3390/ijms20235898. PMID: 31771288; PMCID: PMC6929180.
39. Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol*. 2019 Jun;234(6):8152-8161. Epub 2018 Oct 14. PMID: 30317615. [doi: 10.1002/jcp.27603](https://doi.org/10.1002/jcp.27603).
40. Remesar X, Alemany M. Dietary Energy Partition: The Central Role of Glucose. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 19;21(20):7729. [doi: 10.3390/ijms21207729](https://doi.org/10.3390/ijms21207729). PMID: 33086579; PMCID: PMC7593952.
41. Johannsen NM, Swift DL, Lavie CJ, Earnest CP, Blair SN, Church TS. Combined Aerobic and Resistance Training Effects on Glucose Homeostasis, Fitness, and Other Major Health Indices: A Review of Current Guidelines. *Sports Med*. 2016 Dec;46(12):1809-1818. [doi: 10.1007/s40279-016-0548-3](https://doi.org/10.1007/s40279-016-0548-3). PMID: 27142533.
42. McCabe LR, Irwin R, Tekalur A, Evans C, Schepper JD, Parameswaran N, Ciancio M. Exercise prevents high fat diet-induced bone loss, marrow adiposity and dysbiosis in male mice. *Bone*. 2019 Jan; 118:20-31. [doi: 10.1016/j.bone.2018.03.024](https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.03.024). Epub 2018 Mar 29. Erratum in: *Bone*. 2019 Oct; 127:677-678. PMID: 29604350; PMCID: PMC6163087.
43. Li M, Chi X, Wang Y, Setrerrahmane S, Xie W, Xu H. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. *Signal Transduct Target Ther*. 2022

- Jul 6;7(1):216. doi: 10.1038/s41392-022-01073-0. PMID: 35794109; PMCID: PMC9259665.
44. Sinha S, Haque M. Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus: An Ultimatum to Renal Physiology. *Cureus*. 2022 Sep 8;14(9):e28944. doi: 10.7759/cureus.28944. PMID: 36111327; PMCID: PMC9462660.
 45. International Diabetes Foundation – IDF Diabetes Atlas 10th Edition. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>.
 46. Martin SS, Aday AW, Almarzooq ZI, Anderson CAM, Arora P, Avery CL, Baker-Smith CM, Barone Gibbs B, Beaton AZ, Boehme AK, Commodore-Mensah Y, Currie ME, Elkind MSV, Evenson KR, Generoso G, Heard DG, Hiremath S, Johansen MC, Kalani R, Kazi DS, Ko D, Liu J, Magnani JW, Michos ED, Mussolino ME, Navaneethan SD, Parikh NI, Perman SM, Poudel R, Rezk-Hanna M, Roth GA, Shah NS, St-Onge MP, Thacker EL, Tsao CW, Urbut SM, Van Spall HGC, Voeks JH, Wang NY, Wong ND, Wong SS, Yaffe K, Palaniappan LP; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. 2024 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association. *Circulation*. 2024 Feb 20;149(8):e347-e913. doi: 10.1161/CIR.0000000000001209. Epub 2024 Jan 24. Erratum in: *Circulation*. 2024 May 7;149(19):e1164. PMID: 38264914.
 47. Yang J, Zhang LJ, Wang F, Hong T, Liu Z. Molecular imaging of diabetes and diabetic complications: Beyond pancreatic β -cell targeting. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019 Jan 15; 139:32-50. doi: 10.1016/j.addr.2018.11.007. Epub 2018 Dec 5. PMID: 30529307.
 48. Tomic D, Shaw JE, Magliano DJ. The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2022 Sep;18(9):525-539. doi: 10.1038/s41574-022-00690-7. Epub 2022 Jun 6. PMID: 35668219; PMCID: PMC9169030.

49. Antar SA, Ashour NA, Sharaky M, Khattab M, Ashour NA, Zaid RT, Roh EJ, Elkamhawy A, Al-Karmalawy AA. Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments. *Biomed Pharmacother.* 2023 Dec;168:115734. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115734. Epub 2023 Oct 17. PMID: 37857245.
50. Dlamini M, Khathi A. Prediabetes-Associated Changes in Skeletal Muscle Function and Their Possible Links with Diabetes: A Literature Review. *International Journal of Molecular Sciences.* 2024; 25(1):469. <https://doi.org/10.3390/ijms25010469>.
51. Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KA, Zoungas S, Rossing P, Groop PH, Cooper ME. Diabetic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015 Jul 30;1:15018. doi: 10.1038/nrdp.2015.18. PMID: 27188921; PMCID: PMC7724636.
52. Ahmad K, Choi I, Lee YH. Implications of Skeletal Muscle Extracellular Matrix Remodeling in Metabolic Disorders: Diabetes Perspective. *Int J Mol Sci.* 2020 May 28;21(11):3845. doi: 10.3390/ijms21113845. PMID: 32481704; PMCID: PMC7312063.
53. Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev.* 2013 Jul;93(3):993-1017. doi: 10.1152/physrev.00038.2012. PMID: 23899560.
54. Flores-Opazo M, McGee SL, Hargreaves M. Exercise and GLUT4. *Exerc Sport Sci Rev.* 2020. Jul;48(3):110-118. doi: 10.1249/JES.0000000000000224. PMID: 32568924.
55. Sugimoto K, Ikegami H, Takata Y, Katsuya T, Fukuda M, Akasaka H, Tabara Y, Osawa H, Hiromine Y, Rakugi H. Glycemic Control and Insulin Improve Muscle Mass and Gait Speed in Type 2 Diabetes: The MUSCLES-DM Study. *J Am Med Dir Assoc.*

- 2021 Apr;22(4):834-838.e1. doi: 10.1016/j.jamda.2020.11.003. Epub 2020 Dec 2. PMID: 33278348.
56. Lee SH, Park SY, Choi CS. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes Metab J*. 2022 Jan;46(1):15-37. doi: 10.4093/dmj.2021.0280. Epub 2021 Dec 30. PMID: 34965646; PMCID: PMC8831809.
 57. Francis A, Harhay MN, Ong ACM, Tummalapalli SL, Ortiz A, Fogo AB, Fliser D, Roy-Chaudhury P, Fontana M, Nangaku M, Wanner C, Malik C, Hradsky A, Adu D, Bavanandan S, Cusumano A, Sola L, Ulas I, Jha V; American Society of Nephrology; European Renal Association; International Society of Nephrology. Chronic kidney disease and the global public health agenda: an international consensus. *Nat Rev Nephrol*. 2024 Jul;20(7):473-485. doi: 10.1038/s41581-024-00820-6. Epub 2024 Apr 3. PMID: 38570631.
 58. Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, Zhao MH, Lv J, Garg AX, Knight J, Rodgers A, Gallagher M, Kotwal S, Cass A, Perkovic V. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet*. 2015 May 16;385(9981):1975-82. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61601-9. Epub 2015 Mar 13. PMID: 25777665.
 59. Machado Júnior PAB, Lass A, Pilger BI, Fornazari R, Moraes TP de, Pinho RA. SGLT2 inhibitors and NLRP3 inflammasome: potential target in diabetic kidney disease. *Braz J Nephrol [Internet]*. 2024Oct;46(4):e20230187. Available from: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2023-0187en>.
 60. Lin X, Chen Z, Huang H, Zhong J, Xu L. Diabetic kidney disease progression is associated with decreased lower-limb muscle mass and increased visceral fat area in T2DM patients. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Oct 6; 13:1002118. doi: 10.3389/fendo.2022.1002118. PMID: 36277706; PMCID: PMC9582837.

61. Wang K, Liu Q, Tang M, Qi G, Qiu C, Huang Y, Yu W, Wang W, Sun H, Ni X, Shen Y, Fang X. Chronic kidney disease-induced muscle atrophy: Molecular mechanisms and promising therapies. *Biochem Pharmacol.* 2023 Feb;208:115407. doi: 10.1016/j.bcp.2022.115407. Epub 2022 Dec 31. PMID: 36596414.
62. Nishi H, Higashihara T, Inagi R. Lipotoxicity in Kidney, Heart, and Skeletal Muscle Dysfunction. *Nutrients.* 2019 Jul 20;11(7):1664. doi: 10.3390/nu11071664. PMID: 31330812; PMCID: PMC6682887.
63. Donate-Correa J, Luis-Rodríguez D, Martín-Núñez E, Tagua VG, Hernández-Carballo C, Ferri C, Rodríguez-Rodríguez AE, Mora-Fernández C, Navarro-González JF. Inflammatory Targets in Diabetic Nephropathy. *J Clin Med.* 2020 Feb 7;9(2):458. doi: 10.3390/jcm9020458. PMID: 32046074; PMCID: PMC7074396.
64. Donate-Correa J, Ferri CM, Sánchez-Quintana F, Pérez-Castro A, González-Luis A, Martín-Núñez E, Mora-Fernández C, Navarro-González JF. Inflammatory Cytokines in Diabetic Kidney Disease: Pathophysiologic and Therapeutic Implications. *Front Med (Lausanne).* 2021 Jan 22;7:628289. doi: 10.3389/fmed.2020.628289. PMID: 33553221; PMCID: PMC7862763.
65. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet.* 2014 Mar 22;383(9922):1068-83. doi: [10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6). Epub 2013 Dec 3. PMID: 24315620; PMCID: PMC4226760.
66. Rachdaoui N. Insulin: The Friend and the Foe in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 5;21(5):1770. doi: 10.3390/ijms21051770. PMID: 32150819; PMCID: PMC7084909.

67. Campos C. Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae. *Postgrad Med.* 2012 Nov;124(6):90-7. doi: 10.3810/pgm.2012.11.2615. PMID: 23322142.
68. Vodošek Hojs N, Bevc S, Ekart R, Hojs R. Oxidative Stress Markers in Chronic Kidney Disease with Emphasis on Diabetic Nephropathy. *Antioxidants (Basel).* 2020 Sep 27;9(10):925. doi: 10.3390/antiox9100925. PMID: 32992565; PMCID: PMC7600946.
69. Ma X, Ma J, Leng T, Yuan Z, Hu T, Liu Q, Shen T. Advances in oxidative stress in pathogenesis of diabetic kidney disease and efficacy of TCM intervention. *Ren Fail.* 2023 Dec;45(1):2146512. doi: 10.1080/0886022X.2022.2146512. PMID: 36762989; PMCID: PMC9930779.
70. Bondeva T, Wolf G. Reactive oxygen species in diabetic nephropathy: friend or foe? *Nephrol Dial Transplant.* 2014 Nov;29(11):1998-2003. doi: 10.1093/ndt/gfu037. Epub 2014 Mar 2. PMID: 24589719.
71. Jin Q, Liu T, Qiao Y, Liu D, Yang L, Mao H, Ma F, Wang Y, Peng L, Zhan Y. Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: role of polyphenols. *Front Immunol.* 2023 Jul 21; 14:1185317. doi: 10.3389/fimmu.2023.1185317. PMID: 37545494; PMCID: PMC10401049.
72. Wang N, Zhang C. Oxidative Stress: A Culprit in the Progression of Diabetic Kidney Disease. *Antioxidants (Basel).* 2024 Apr 12;13(4):455. doi: 10.3390/antiox13040455. PMID: 38671903; PMCID: PMC11047699.
73. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004 Dec;114(12):1752-61. doi: [10.1172/JCI21625](https://doi.org/10.1172/JCI21625). PMID: 15599400; PMCID: PMC535065.

74. Bird SR, Hawley JA. Update on the effects of physical activity on insulin sensitivity in humans. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2017 Mar 1;2(1):e000143. doi: 10.1136/bmjsem-2016-000143. PMID: 28879026; PMCID: PMC5569266.
75. Geng L, Liao B, Jin L, Huang Z, Triggie C, Ding H, Zhang J, Huang Y and Lin Z. Exercise Alleviates Obesity-Induced Metabolic Dysfunction via Enhancing FGF21 Sensitivity in Adipose Tissues. 2019. *Cell Reports* 26, 2738–2752. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.014>.
76. Hall, J. E. (2015). *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*. Elsevier Health Sciences: Amsterdam.
77. Moraes-Vieira PM, Saghatelian A, Kahn BB. GLUT4 Expression in Adipocytes Regulates De Novo Lipogenesis and Levels of a Novel Class of Lipids With Antidiabetic and Anti-inflammatory Effects. *Diabetes.* 2016 Jul;65(7):1808-15. doi: [10.2337/db16-0221](https://doi.org/10.2337/db16-0221). Epub 2016 Jun 10. PMID: 27288004; PMCID: PMC4915575.
78. Lavorato VN, Miranda DC, Isoldi MC, Drummond FR, Soares LL, Reis ECC, Pelúzio MDCG, Pedrosa ML, Silva ME, Natali AJ. Effects of aerobic exercise training and açai supplementation on cardiac structure and function in rats submitted to a high-fat diet. *Food Res Int.* 2021 Mar;141:110168. doi: [10.1016/j.foodres.2021.110168](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110168). Epub 2021 Feb 1. PMID: 33642024.
79. Tandon S, Ayis S, Hopkins D, Harding S, Stadler M. The impact of pharmacological and lifestyle interventions on body weight in people with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab.* 2021 Feb;23(2):350-362. doi: [10.1111/dom.14221](https://doi.org/10.1111/dom.14221). Epub 2020 Nov 2. PMID: 33026152.
80. Butragueño J, Ruiz JR. Metabolic alliance: pharmacotherapy and exercise management of obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2024 Jun 5. doi: 10.1038/s41574-024-01006-7. Epub ahead of print. PMID: 38839938.

81. Bull FC, Al-Ansari SS, Biddle S, Borodulin K, Buman MP, Cardon G, Carty C, Chaput JP, Chastin S, Chou R, Dempsey PC, DiPietro L, Ekelund U, Firth J, Friedenreich CM, Garcia L, Gichu M, Jago R, Katzmarzyk PT, Lambert E, Leitzmann M, Milton K, Ortega FB, Ranasinghe C, Stamatakis E, Tiedemann A, Troiano RP, van der Ploeg HP, Wari V, Willumsen JF. World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *Br J Sports Med.* 2020 Dec;54(24):1451-1462. doi: [10.1136/bjsports-2020-102955](https://doi.org/10.1136/bjsports-2020-102955). PMID: 33239350; PMCID: PMC7719906.
82. Riddell MC, Gallen IW, Smart CE, Taplin CE, Adolfsson P, Lumb AN, Kowalski A, Rabasa-Lhoret R, McCrimmon RJ, Hume C, Annan F, Fournier PA, Graham C, Bode B, Galassetti P, Jones TW, Millán IS, Heise T, Peters AL, Petz A, Laffel LM. Exercise management in type 1 diabetes: a consensus statement. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 May;5(5):377-390. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30014-1. Epub 2017 Jan 24. Erratum in: *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 May;5(5):e3. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30086-4. PMID: 28126459.
83. Carré JE, Affourtit C. Mitochondrial Activity and Skeletal Muscle Insulin Resistance in Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 5;20(11):2751. doi: 10.3390/ijms20112751. PMID: 31195596; PMCID: PMC6600571.
84. Maric-Bilkan C. Obesity and diabetic kidney disease. *Med Clin North Am.* 2013 Jan;97(1):59-74. doi: 10.1016/j.mcna.2012.10.010. Epub 2012 Nov 27. PMID: 23290730; PMCID: PMC3539140.
85. Chomiuk T, Niezgoda N, Mamcarz A, Śliż D. Physical activity in metabolic syndrome. *Front Physiol.* 2024 Feb 19;15:1365761. doi: 10.3389/fphys.2024.1365761. PMID: 38440349; PMCID: PMC10910017.
86. Syeda USA, Battillo D, Visaria A, Malin SK. The importance of exercise for glycemic control in type 2 diabetes. *Am J Med Open.* Vol 9, 2023. ISSN 2667-0364.

<https://doi.org/10.1016/j.ajmo.2023.100031>.

87. Oppert JM, Bellicha A, van Baak MA, Battista F, Beaulieu K, Blundell JE, Carraça EV, Encantado J, Ermolao A, Pramono A, Farpour-Lambert N, Woodward E, Dicker D, Busetto L. Exercise training in the management of overweight and obesity in adults: Synthesis of the evidence and recommendations from the European Association for the Study of Obesity Physical Activity Working Group. *Obes Rev*. 2021 Jul;22 Suppl 4(Suppl 4):e13273. doi: 10.1111/obr.13273. Epub 2021 Jun 2. PMID: 34076949; PMCID: PMC8365734.
88. Singleton JR, Foster-Palmer S, Marcus RL. Exercise as Treatment for Neuropathy in the Setting of Diabetes and Prediabetic Metabolic Syndrome: A Review of Animal Models and Human Trials. *Curr Diabetes Rev*. 2022;18(5):e230921196752. doi: 10.2174/1573399817666210923125832. PMID: 34561989.
89. Böhm M, Schumacher H, Werner C, Teo KK, Lonn EM, Mahfoud F, Speer T, Mancina G, Redon J, Schmieder RE, Sliwa K, Marx N, Weber MA, Laufs U, Williams B, Yusuf S, Mann JFE. Association between exercise frequency with renal and cardiovascular outcomes in diabetic and non-diabetic individuals at high cardiovascular risk. *Cardiovasc Diabetol*. 2022 Jan 20;21(1):12. doi: 10.1186/s12933-021-01429-w. PMID: 35057807; PMCID: PMC8772075.
90. Bloomer RJ, Goldfarb AH. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can J Appl Physiol*. 2004 Jun;29(3):245-63. doi: 10.1139/h04-017. PMID: 15199226.
91. di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*. 2001 Jan-Apr;10(1-2):125-40. doi: 10.1159/000046880. PMID: 11223645.
92. Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-

- inflammatory properties. *Cardiovasc Diabetol*. 2011 Jan 28;10:12. doi: [10.1186/1475-2840-10-12](https://doi.org/10.1186/1475-2840-10-12). PMID: 21276212; PMCID: PMC3041659.
93. Mousavi SR, Jafari M, Rezaei S, Agha-Alinejad H, Sobhani V. Evaluation of the effects of different intensities of forced running wheel exercise on oxidative stress biomarkers in muscle, liver and serum of untrained rats. *Lab Anim (NY)*. 2020 Apr;49(4):119-125. doi: [10.1038/s41684-020-0503-7](https://doi.org/10.1038/s41684-020-0503-7). Epub 2020 Mar 23. PMID: 32203319.
 94. Quan H, Koltai E, Suzuki K, Aguiar AS Jr, Pinho R, Boldogh I, Berkes I, Radak Z. Exercise, redox system and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 Oct 1;1866(10):165778. doi: [10.1016/j.bbadis.2020.165778](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165778). Epub 2020 Mar 25. PMID: 32222542.
 95. Shou J, Chen PJ, Xiao WH. Mechanism of increased risk of insulin resistance in aging skeletal muscle. *Diabetol Metab Syndr*. 2020 Feb 11;12:14. doi: [10.1186/s13098-020-0523-x](https://doi.org/10.1186/s13098-020-0523-x). PMID: 32082422; PMCID: PMC7014712.
 96. Malone JJ, Hulton AT, MacLaren DPM. Exogenous carbohydrate and regulation of muscle carbohydrate utilisation during exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2021 May;121(5):1255-1269. doi: [10.1007/s00421-021-04609-4](https://doi.org/10.1007/s00421-021-04609-4). Epub 2021 Feb 5. PMID: 33544230; PMCID: PMC8064975.
 97. Spaulding HR, Yan Z. AMPK and the Adaptation to Exercise. *Annu Rev Physiol*. 2022 Feb 10;84:209-227. doi: [10.1146/annurev-physiol-060721-095517](https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-060721-095517). PMID: 35143330; PMCID: PMC8919726.
 98. Entezari M, Hashemi D, Taheriazam A, Zabolian A, Mohammadi S, Fakhri F, Hashemi M, Hushmandi K, Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Ertas YN, Mirzaei S, Samarghandian S. AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: A pre-clinical and clinical investigation. *Biomed*

Pharmacother. 2022 Feb;146:112563. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112563. Epub 2021 Dec 29. PMID: 35062059.

99. Savova MS, Mihaylova LV, Tews D, Wabitsch M, Georgiev MI. Targeting PI3K/AKT signaling pathway in obesity. *Biomed Pharmacother.* 2023 Mar;159:114244. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114244. Epub 2023 Jan 11. PMID: 36638594.
100. Gomez-Cabrera MC, Salvador-Pascual A, Cabo H, Ferrando B, Vina J. Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training? Vol. 86, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2015. p. 37–46. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.006](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.006).
101. Leeuwenburgh C, Heinecke J. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. *Curr Med Chem.* 2012 Oct 29;8(7):829–38. doi: [10.2174/0929867013372896](https://doi.org/10.2174/0929867013372896).
102. Ishikawa Y, Gohda T, Tanimoto M, Omote K, Furukawa M, Yamaguchi S, et al. Effect of exercise on kidney function, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic KK- A y mice. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012. doi: [10.1155/2012/702948](https://doi.org/10.1155/2012/702948).
103. Teixeira de Lemos E, Reis F, Baptista S, Pinto R, Sepodes B, Vala H, et al. Exercise training decreases proinflammatory profile in Zucker diabetic (type 2) fatty rats. *Nutrition.* 2009 Mar;25(3):330–9. doi: [10.1016/j.nut.2008.08.014](https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.08.014).
104. Rodrigues AM, Bergamaschi CT, Fernandes MJS, Paredes-Gamero EJ, Curi MV, Ferreira AT, et al. P2x7 receptor in the kidneys of diabetic rats submitted to aerobic training or to N-acetylcysteine supplementation. *PLoS One.* 2014 Jun 18;9(6). doi: [10.1371/journal.pone.0097452](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097452).
105. Rodrigues AM, Bergamaschi CT, Araújo RC, Mouro MG, Rosa TS, Higa EMS. Effects of training and nitric oxide on diabetic nephropathy progression in type I diabetic rats. *Exp Biol Med.* 2011 Oct;236(10):1180–7. doi: [10.1258/ebm.2011.011005](https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011005).

106. Amaral LSB, Souza CS, Volpini RA, Shimizu MHM, De Bragança AC, Canale D, et al. Previous exercise training reduces markers of renal oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic female rats. *J Diabetes Res.* 2018;2018. doi: [10.1155/2018/6170352](https://doi.org/10.1155/2018/6170352).
107. Thirupathi A, Gu Y, Pinho RA. Exercise Cuts Both Ways with ROS in Remodifying Innate and Adaptive Responses: Rewiring the Redox Mechanism of the Immune System during Exercise. *Antioxidants (Basel).* 2021 Nov 21;10(11):1846. doi: [10.3390/antiox10111846](https://doi.org/10.3390/antiox10111846). PMID: 34829717; PMCID: PMC8615250.
108. Idris I, Donnelly R. Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors: an emerging new class of oral antidiabetic drug. *Diabetes Obes Metab.* 2009 Feb;11(2):79-88. doi: [10.1111/j.1463-1326.2008.00982.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00982.x). PMID: 19125776.
109. Dominguez Rieg JA, Rieg T. What does sodium-glucose co-transporter 1 inhibition add: Prospects for dual inhibition. Vol. 21, *Diabetes, Obesity and Metabolism*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 43–52. doi: [10.1111/dom.13630](https://doi.org/10.1111/dom.13630). PMID: 31081587; PMCID: PMC6516085.
110. Wright EM. Renal Na⁺-glucose cotransporters. Vol. 280, *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. American Physiological Society; 2001. doi: [10.1152/ajprenal.2001.280.1.F10](https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.1.F10).
111. Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, Kashani F, Roohani S, Welschhof P, Kopp M, Gödtel-Armbrust U, Xia N, Li H, Schulz E, Lackner KJ, Wojnowski L, Bottari SP, Wenzel P, Mayoux E, Münzel T, Daiber A. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol.* 2017 Oct;13:370-385. doi: [10.1016/j.redox.2017.06.009](https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.06.009). Epub 2017 Jun 22. PMID: 28667906; PMCID: PMC5491464.
112. Scheen AJ, Paquot N. Metabolic effects of SGLT-2 inhibitors beyond increased

- glucosuria: A review of the clinical evidence. *Diabetes Metab.* 2014 Dec 1;40(6):S4–11. doi: [10.1016/S1262-3636\(14\)72689-8](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(14)72689-8). PMID: 25554070.
113. Chao EC. SGLT-2 inhibitors: A new mechanism for glycemic control. *Clin Diabetes.* 2014 Jan;32(1):4–11. doi: [10.2337/diaclin.32.1.4](https://doi.org/10.2337/diaclin.32.1.4). PMID: 26246672; PMCID: PMC4521423.
 114. Pereira MJ, Eriksson JW. Emerging Role of SGLT-2 Inhibitors for the Treatment of Obesity. *Drugs.* 2019 Feb;79(3):219-230. doi: [10.1007/s40265-019-1057-0](https://doi.org/10.1007/s40265-019-1057-0). PMID: 30701480; PMCID: PMC6394798.
 115. Sano R, Shinozaki Y, Ohta T. Sodium-glucose cotransporters: Functional properties and pharmaceutical potential. *J Diabetes Investig.* 2020 Jul;11(4):770-782. doi: [10.1111/jdi.13255](https://doi.org/10.1111/jdi.13255). Epub 2020 Apr 16. PMID: 32196987; PMCID: PMC7378437.
 116. Cefalu WT. Paradoxical insights into whole body metabolic adaptations following SGLT2 inhibition. Vol. 124, *Journal of Clinical Investigation.* J Clin Invest; 2014. p. 485–7. doi: [10.1172/JCI74297](https://doi.org/10.1172/JCI74297). Epub 2014 Jan 27. PMID: 24463446; PMCID: PMC3904638.
 117. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A novel approach to control hyperglycemia in type 2 diabetes: Sodium glucose co-transport (SGLT) inhibitors. Systematic review and meta-analysis of randomized trials. Vol. 44, *Annals of Medicine.* Ann Med; 2012. p. 375–93. doi: [10.3109/07853890.2011.560181](https://doi.org/10.3109/07853890.2011.560181). Epub 2011 Apr 15. PMID: 21495788.
 118. Perkovic V, Jardine MJ, Neal B, Bompoint S, Heerspink HJL, Charytan DM, et al. Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Engl J Med.* 2019 Jun 13;380(24):2295–306. doi: [10.1056/NEJMoa1811744](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1811744). Epub 2019 Apr 14. PMID: 30990260.
 119. Thomas MC. Renal effects of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes. Vol. 5,

Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism. *Ther Adv Endocrinol Metab*; 2014. p. 53–61. doi: [10.1177/2042018814544153](https://doi.org/10.1177/2042018814544153). PMID: 25126408; PMCID: PMC4132377.

120. Charlton A, Garzarella J, Jandeleit-Dahm KAM, Jha JC. Oxidative Stress and Inflammation in Renal and Cardiovascular Complications of Diabetes. *Biology (Basel)*. 2020 Dec 30;10(1):18. doi: [10.3390/biology10010018](https://doi.org/10.3390/biology10010018). PMID: 33396868; PMCID: PMC7830433.
121. DeFronzo RA, Reeves WB, Awad AS. Pathophysiology of diabetic kidney disease: impact of SGLT2 inhibitors. *Nat Rev Nephrol*. 2021 May;17(5):319-334. doi: [10.1038/s41581-021-00393-8](https://doi.org/10.1038/s41581-021-00393-8). Epub 2021 Feb 5. PMID: 33547417.
122. Theofilis P, Sagris M, Oikonomou E, Antonopoulos AS, Siasos G, Tsioufis K, Tousoulis D. The impact of SGLT2 inhibitors on inflammation: A systematic review and meta-analysis of studies in rodents. *Int Immunopharmacol*. 2022 Oct;111:109080. doi: [10.1016/j.intimp.2022.109080](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109080). Epub 2022 Jul 28. PMID: 35908505.
123. Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, Yamajuku D, Kihara R, Hayashizaki Y, Takasu T, Imamura M, Li Q, Tomiyama H, Kobayashi Y, Noda A, Sasamata M, Shibasaki M. Effects of sodium-glucose cotransporter 2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycaemia, oxidative stress, inflammation and liver injury in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*. 2014 Jul;66(7):975-87. doi: [10.1111/jphp.12223](https://doi.org/10.1111/jphp.12223). Epub 2014 Feb 17. PMID: 24533859.
124. Panchapakesan U, Pegg K, Gross S, Komala MG, Mudaliar H, Forbes J, Pollock C, Mather A. Effects of SGLT2 inhibition in human kidney proximal tubular cells--renoprotection in diabetic nephropathy? *PLoS One*. 2013;8(2):e54442. doi: [10.1371/journal.pone.0054442](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054442). Epub 2013 Feb 4. PMID: 23390498; PMCID: PMC3563635.

125. Xu L, Nagata N, Nagashimada M, Zhuge F, Ni Y, Chen G, Mayoux E, Kaneko S, Ota T. SGLT2 Inhibition by Empagliflozin Promotes Fat Utilization and Browning and Attenuates Inflammation and Insulin Resistance by Polarizing M2 Macrophages in Diet-induced Obese Mice. *EBioMedicine*. 2017 Jun;20:137-149. Epub 2017 May 26. PMID: 28579299.
126. Kleibert M, Zygmunciak P, Łakomska K, Mila K, Zgliczyński W, Mrozikiewicz-Rakowska B. Insight into the Molecular Mechanism of Diabetic Kidney Disease and the Role of Metformin in Its Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2023 Aug 22;24(17):13038. doi: 10.3390/ijms241713038. PMID: 37685845; PMCID: PMC10487922.
127. Wang Q, Hu J, Liu Y, Li J, Liu B, Li M, Lou S. Aerobic Exercise Improves Synaptic-Related Proteins of Diabetic Rats by Inhibiting FOXO1/NF- κ B/NLRP3 Inflammatory Signaling Pathway and Ameliorating PI3K/Akt Insulin Signaling Pathway. *J Mol Neurosci*. 2019 Sep;69(1):28-38. doi: 10.1007/s12031-019-01302-2. Epub 2019 May 21. PMID: 31111330.
128. Yaribeygi H, Atkin SL, Butler AE, Sahebkar A. Sodium-glucose cotransporter inhibitors and oxidative stress: An update. *J. Cell Physiol*. 2019, 234, 3231–3237.
129. Oshima H, Miki T, Kuno A, Mizuno M, Sato T, Tanno M, Yano T, Nakata K, Kimura Y, Abe K, et al. Empagliflozin, an sglt2 inhibitor, reduced the mortality rate after acute myocardial infarction with modification of cardiac metabolomes and antioxidants in diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2019, 368, 524–534.
130. Osorio H, Coronel I, Arellano A, Pacheco U, Bautista R, Franco M, Escalante B. Sodium-glucose cotransporter inhibition prevents oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2012, 2012, 542042.
131. Tsai KF, Chen YL, Chiou TT, Chu TH, Li LC, Ng HY, Lee WC, Lee CT. Emergence of SGLT2 Inhibitors as Powerful Antioxidants in Human Diseases. *Antioxidants*

(Basel). 2021 Jul 22;10(8):1166. doi: 10.3390/antiox10081166. PMID: 34439414; PMCID: PMC8388972.

132. Brosius FC 3rd, Alpers CE, Bottinger EP, Breyer MD, Coffman TM, Gurley SB, Harris RC, Kakoki M, Kretzler M, Leiter EH, Levi M, McIndoe RA, Sharma K, Smithies O, Susztak K, Takahashi N, Takahashi T; Animal Models of Diabetic Complications Consortium. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Dec;20(12):2503-12. doi: 10.1681/ASN.2009070721. Epub 2009 Sep 3. PMID: 19729434; PMCID: PMC4075053.
133. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*. 2005 Oct;52(4):313–20
134. Giralt-López A, Den Bosch MM Van, Vergara A, García-Carro C, Seron D, Jacobs-Cachá C, et al. Revisiting experimental models of diabetic nephropathy. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020.
135. Kim DH, Choi BH, Ku SK, Park JH, Oh E, Kwak MK. Beneficial Effects of Sarpogrelate and Rosuvastatin in High Fat Diet/Streptozotocin-Induced Nephropathy in Mice. *PLoS One*. 2016 Apr 20;11(4):e0153965. doi: 10.1371/journal.pone.0153965. PMID: 27097221; PMCID: PMC4838298.
136. Breyer MD, Böttinger E, Brosius FC 3rd, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, Sharma K; AMDCC. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jan;16(1):27-45. doi: 10.1681/ASN.2004080648. Epub 2004 Nov 24. PMID: 15563560.
137. Abdurrachim D, Manders E, Nicolay K, Mayoux E, Prompers JJ. Single dose of empagliflozin increases in vivo cardiac energy status in diabetic db/db mice. *Cardiovasc Res*. 2018 Dec 1;114(14):1843-1844. doi: 10.1093/cvr/cvy246. PMID:

30295756.

138. Pennig J, Scherrer P, Gissler MC, Anto-Michel N, Hoppe N, Funer L, et al. Glucose lowering by SGLT2-inhibitor empagliflozin accelerates atherosclerosis regression in hyperglycemic STZ-diabetic mice. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9(1).
139. Takahashi H, Nomiyama T, Terawaki Y, Horikawa T, Kawanami T, Hamaguchi Y, et al. Combined treatment with DPP-4 inhibitor linagliptin and SGLT2 inhibitor empagliflozin attenuates neointima formation after vascular injury in diabetic mice. *Biochem Biophys Reports.* 2019 Jul 1;18.
140. Ideishi A, Suematsu Y, Tashiro K, Morita H, Kuwano T, Tomita S, Nakai K, Miura SI. Combination of Linagliptin and Empagliflozin Preserves Cardiac Systolic Function in an Ischemia-Reperfusion Injury Mice With Diabetes Mellitus. *Cardiol Res.* 2021 Apr;12(2):91-97. doi: 10.14740/cr1194. Epub 2021 Jan 24. PMID: 33738012; PMCID: PMC7935637.
141. Radlinger B, Ress C, Folie S, Salzmann K, Lechuga A, Weiss B, Salvenmoser W, Graber M, Hirsch J, Holfeld J, Kremser C, Moser P, Staudacher G, Jelenik T, Roden M, Tilg H, Kaser S. Empagliflozin protects mice against diet-induced obesity, insulin resistance and hepatic steatosis. *Diabetologia.* 2023 Apr;66(4):754-767. doi: 10.1007/s00125-022-05851-x. Epub 2022 Dec 16. PMID: 36525084; PMCID: PMC9947060.
142. Vilela TC, Effting PS, dos Santos Pedroso G, Farias H, Paganini L, Rebelo Sorato H, et al. Aerobic and strength training induce changes in oxidative stress parameters and elicit modifications of various cellular components in skeletal muscle of aged rats. *Exp Gerontol.* 2018 Jun 1; 106:21–7.
143. Cybulsky AV, Takano T, Papillon J, Guillemette J, Herzenberg AM, Kennedy CR (2010) Podocyte injury and albuminuria in mice with podocyte-specific overexpression

of the Ste20-like kinase, SLK. Am J Pathol 177:2290–2299.

144. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra?codteor=1257742#:~:text=RDC%20N%C2%BA%20306%2C%20DE%207%20DE%20DEZEMBRO%20DE%202004&text=2%C2%BA%20Compete%20%C3%A0%20Vigil%C3%A2ncia%20Sanit%C3%A1ria,fiscalizar%20o%20cumprimento%20desta%20Resolu%C3%A7%C3%A3o%20.
145. Gunzler W, Flohe-Clairborne A. (1985) Glutathione peroxidase. In: Green-Wald, R.A., Ed., Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, CRC Press, Boca Ratón, 285-290.
146. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. Nat Protoc. 2010 Jan;5(1):51-66.
147. Tüközan N, Erdamar H, Seven I. Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. Firat Tıp Dergisi, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 88–92, 2006.
148. Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-donne I. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, [s. l.], v. 1019, p. 178–190, 2016.
149. de Farias JM, Bom KF, Tromm CB, Luciano TF, Marques SO, Tuon T, Silva LA, Lira FS, de Souza CT, Pinho RA. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. Horm Metab Res. 2013 Mar;45(3):190-6. doi: 10.1055/s-0032-1323740. Epub 2012 Sep 12. PMID: 22972182.

150. Sun X, Han F, Lu Q, Li X, Ren D, Zhang J, Han Y, Xiang YK, Li J. Empagliflozin Ameliorates Obesity-Related Cardiac Dysfunction by Regulating Sestrin2-Mediated AMPK-mTOR Signaling and Redox Homeostasis in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes*. 2020 Jun;69(6):1292-1305. doi: 10.2337/db19-0991. Epub 2020 Mar 31. PMID: 32234722.
151. Avtanski D, Pavlov VA, Tracey KJ, Poretsky L. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. *Animal Model Exp Med*. 2019 Sep 25;2(4):252-258. doi: 10.1002/ame2.12084. PMID: 31942557; PMCID: PMC6930989.
152. Gangadharan Komala M, Gross S, Mudaliar H, Huang C, Pegg K, Mather A, Shen S, Pollock CA, Panchapakesan U. Inhibition of kidney proximal tubular glucose reabsorption does not prevent against diabetic nephropathy in type 1 diabetic eNOS knockout mice. *PLoS One*. 2014 Nov 4;9(11):e108994. doi: 10.1371/journal.pone.0108994. PMID: 25369239; PMCID: PMC4219667.
153. Lai ZL., Tseng CH, Ho HJ, *et al*. Fecal microbiota transplantation confers beneficial metabolic effects of diet and exercise on diet-induced obese mice. *Sci Rep* 8, 15625 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33893-y>.
154. Lopes Pereira, J, Sampaio e Souza, PC, Shinzato, VI, Sasso, S, do Espirito Santo, BLS, Santana, LF, Restel, TI and Freitas, KC. Weight gain and metabolic changes in mice submitted to high fat diet. *Ciência e Saúde* 2018 jan-mar, 11(1):51-57. doi: <http://dx.doi.org/10.15448/1983-652X.2018.1.27672>.
155. Kunz RI, Capelassi AN, Alegre-Maller AC, Bonfleur ML, Ribeiro LF, Costa RM, *et al*. Sericina como tratamento da obesidade: efeitos morfofisiológicos de camundongos obesos por dieta hiperlipídica. *einstein* (São Paulo). 2020;18:eAO4876. http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO4876.

156. Le Beyec J, Pelletier AL, Arapis K, Hourseau M, Cluzeaud F, Descatoire V, Ducroc R, Aparicio T, Joly F, Couvelard A, Marmuse JP, Le Gall M, Bado A. Overexpression of gastric leptin precedes adipocyte leptin during high-fat diet and is linked to 5HT-containing enterochromaffin cells. *Int J Obes (Lond)*. 2014 Oct;38(10):1357-64. doi: 10.1038/ijo.2014.14. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24468700.
157. Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019 Jan 25;12:191-198. doi: 10.2147/DMSO.S182406. PMID: 30774404; PMCID: PMC6354688.
158. Mendoza-Herrera K, Florio AA, Moore M, Marrero A, Tamez M, Bhupathiraju SN, Mattei J. The Leptin System and Diet: A Mini Review of the Current Evidence. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Nov 24;12:749050. doi: 10.3389/fendo.2021.749050. PMID: 34899599; PMCID: PMC8651558.
159. Oishi K, Hashimoto C. Short-term time-restricted feeding during the resting phase is sufficient to induce leptin resistance that contributes to development of obesity and metabolic disorders in mice. *Chronobiol Int*. 2018 Oct;35(11):1576-1594. doi: 10.1080/07420528.2018.1496927. Epub 2018 Aug 7. PMID: 30084652.
160. Micarelli A, Malacrida S, Strapazzon G, Mrakic-Sposta S, Micarelli B, Alessandrini N, Carbini V, Caputo S, Falla M, Alessandrini M. Impact of Nutritional Intervention on Taste Perception—A Scoping Review. *Foods* **2021**, *10*, 2747. <https://doi.org/10.3390/foods10112747>.
161. Ahart ZC, Martin LE, Kemp BR, Dutta Banik D, Roberts SGE, Torregrossa AM, Medler KF. Differential Effects of Diet and Weight on Taste Responses in Diet-Induced Obese Mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2020 Feb;28(2):284-292. doi: 10.1002/oby.22684. Epub 2019 Dec 31. PMID: 31891242; PMCID: PMC6981059.

162. de Wilde J, Mohren R, van den Berg S, Boekschoten M, Dijk KW, de Groot P, Müller M, Mariman E, Smit E. Short-term high fat-feeding results in morphological and metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6J mice. *Physiol Genomics*. 2008 Feb 19;32(3):360-9. doi: 10.1152/physiolgenomics.00219.2007. Epub 2007 Nov 27. PMID: 18042831.
163. Martyn JA, Kaneki M, Yasuhara S. Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology*. 2008 Jul;109(1):137-48. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181799d45. PMID: 18580184; PMCID: PMC3896971.
164. González P, Lozano P, Ros G, Solano F. Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. *Int J Mol Sci*. 2023 May 27;24(11):9352. doi: 10.3390/ijms24119352. PMID: 37298303; PMCID: PMC10253853.
165. Wu T, Ding L, Andoh V, Zhang J, Chen L. The Mechanism of Hyperglycemia-Induced Renal Cell Injury in Diabetic Nephropathy Disease: An Update. *Life (Basel)*. 2023 Feb 15;13(2):539. doi: 10.3390/life13020539. PMID: 36836895; PMCID: PMC9967500.
166. Ormonde C, Laranjinha I, Gil C, Gonçalves M, A Gaspar A. Glycosuria in primary glomerulopathies: prevalence and prognostic significance. *J Bras Nefrol*. 2022 Jan-Mar;44(1):26-31. doi: 10.1590/2175-8239-JBN-2021-0115. PMID: 34424258; PMCID: PMC8943878.
167. Raja P, Maxwell AP, Brazil DP. The Potential of Albuminuria as a Biomarker of Diabetic Complications. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2021 Jun;35(3):455-466. doi: 10.1007/s10557-020-07035-4. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32681438; PMCID: PMC8105227.

168. Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomed Pharmacother.* 2017 Nov;95:605-613. doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.098. Epub 2017 Sep 4. PMID: 28881291.
169. Glastras SJ, Chen H, Teh R, McGrath RT, Chen J, Pollock CA, Wong MG, Saad S. Mouse Models of Diabetes, Obesity and Related Kidney Disease. *PLoS One.* 2016 Aug 31;11(8):e0162131. doi: 10.1371/journal.pone.0162131. PMID: 27579698; PMCID: PMC5006968.
170. Wang XH, Mitch WE. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2014 Sep;10(9):504-16. doi: 10.1038/nrneph.2014.112. Epub 2014 Jul 1. PMID: 24981816; PMCID: PMC4269363.
171. Schardong J, Marcolino MAZ, Plentz RDM. Muscle Atrophy in Chronic Kidney Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1088:393-412. doi: 10.1007/978-981-13-1435-3_18. PMID: 30390262.
172. Noshahr ZS, Salmani H, Khajavi Rad A, Sahebkar A. Animal Models of Diabetes - Associated Renal Injury. *J Diabetes Res.* 2020 May 20;2020:9416419. doi: 10.1155/2020/9416419. PMID: 32566684; PMCID: PMC7256713.
173. Saberi S, Askaripour M, Khaksari M, Amin Rajizadeh M, Abbas Bejeshk M, Akhbari M, Jafari E, Khoramipour K. Exercise training improves diabetic renal injury by reducing fetuin-A, oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic rats. *Heliyon.* 2024 Mar 12;10(6):e27749. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e27749. PMID: 38510054; PMCID: PMC10951597.
174. Kim YJ, Kim HJ, Lee SG, Kim DH, In Jang S, Go HS, Lee WJ, Seong JK. Aerobic exercise for eight weeks provides protective effects towards liver and cardiometabolic health and adipose tissue remodeling under metabolic stress for one week: A study in

- mice. *Metabolism*. 2022 May;130:155178. doi: 10.1016/j.metabol.2022.155178. Epub 2022 Feb 25. PMID: 35227728.
175. Linden MA, Ross TT, Beebe DA, Gorgoglione MF, Hamilton KL, Miller BF, Braun B, Esler WP. The combination of exercise training and sodium-glucose cotransporter-2 inhibition improves glucose tolerance and exercise capacity in a rodent model of type 2 diabetes. *Metabolism*. 2019 Aug;97:68-80. doi: 10.1016/j.metabol.2019.05.009. Epub 2019 May 25. PMID: 31132381.
 176. Ferrari F, Bock PM, Motta MT, Helal L. Biochemical and Molecular Mechanisms of Glucose Uptake Stimulated by Physical Exercise in Insulin Resistance State: Role of Inflammation. *Arq Bras Cardiol*. 2019 Dec;113(6):1139-1148. doi: 10.5935/abc.20190224. PMID: 31644699; PMCID: PMC7021273.
 177. Andrade EF, Silva VO, Moura NO, Foureaux RC, Orlando DR, Moura RF, Pereira LJ. Physical Exercise Improves Glycemic and Inflammatory Profile and Attenuates Progression of Periodontitis in Diabetic Rats (HFD/STZ). *Nutrients*. 2018 Nov 7;10(11):1702. doi: 10.3390/nu10111702. PMID: 30405072; PMCID: PMC6265772.
 178. Newman AA, Grimm NC, Wilburn JR, Schoenberg HM, Trikha SRJ, Luckasen GJ, Biela LM, Melby CL, Bell C. Influence of Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibition on Physiological Adaptation to Endurance Exercise Training. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 Jun 1;104(6):1953-1966. doi: 10.1210/jc.2018-01741. PMID: 30597042.
 179. Tan AL, Sourris KC, Harcourt BE, Thallas-Bonke V, Penfold S, Andrikopoulos S, Thomas MC, O'Brien RC, Bierhaus A, Cooper ME, Forbes JM, Coughlan MT. Disparate effects on renal and oxidative parameters following RAGE deletion, AGE accumulation inhibition, or dietary AGE control in experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Mar;298(3):F763-70. doi: 10.1152/ajprenal.00591.2009. Epub 2009 Dec 16. PMID: 20015941.

180. Dugan LL, You YH, Ali SS, Diamond-Stanic M, Miyamoto S, DeClevés AE, Andreyev A, Quach T, Ly S, Shekhtman G, Nguyen W, Chepetan A, Le TP, Wang L, Xu M, Paik KP, Fogo A, Viollet B, Murphy A, Brosius F, Naviaux RK, Sharma K. AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function. *J Clin Invest.* 2013 Nov;123(11):4888-99. doi: 10.1172/JCI66218. Epub 2013 Oct 25. PMID: 24135141; PMCID: PMC3809777.
181. Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 Mar;294(3):R673-80. doi: 10.1152/ajpregu.00561.2007. Epub 2007 Dec 19. PMID: 18094066.
182. Monno I, Ogura Y, Xu J, Koya D, Kitada M. Exercise Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Type 2 Diabetic Fatty Rats. *Antioxidants (Basel).* 2021 Nov 3;10(11):1754. doi: 10.3390/antiox10111754. PMID: 34829625; PMCID: PMC8614720.
183. Jackson MJ, Stretton C, McArdle A. Hydrogen peroxide as a signal for skeletal muscle adaptations to exercise: What do concentrations tell us about potential mechanisms? *Redox Biol.* 2020 Aug;35:101484. doi: 10.1016/j.redox.2020.101484. Epub 2020 Feb 29. PMID: 32184060; PMCID: PMC7284923.
184. Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem.* 2014 Mar 28;289(13):8735-41. doi: 10.1074/jbc.R113.544635. Epub 2014 Feb 10. PMID: 24515117; PMCID: PMC3979367.
185. Henriksen EJ. Effects of H₂O₂ on insulin signaling the glucose transport system in mammalian skeletal muscle. *Methods Enzymol.* 2013;528:269-78. doi: 10.1016/B978-0-12-405881-1.00016-1. PMID: 23849871.
186. Atanasovska E, Tasic V, Slaninka-Miceska M, Alabakovska S, Zafirov D, Kostova E, Pavlovska K, Filipce V, Labacevski N. Six week follow-up of metabolic effects

- induced by a high-fat diet and streptozotocin in a rodent model of type 2 diabetes mellitus. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*. 2014;35(1):169-79. PMID: 24798603.
187. Rohrbach S, Gruenler S, Teschner M, Holtz J. The thioredoxin system in aging muscle: key role of mitochondrial thioredoxin reductase in the protective effects of caloric restriction? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Oct;291(4):R927-35. doi: 10.1152/ajpregu.00890.2005. Epub 2006 May 4. PMID: 16675629.
 188. Guo C, Sileikaite I, Davies MJ, Hawkins CL. Myeloperoxidase Modulates Hydrogen Peroxide Mediated Cellular Damage in Murine Macrophages. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Dec 10;9(12):1255. doi: 10.3390/antiox9121255. PMID: 33321763; PMCID: PMC7764223.
 189. Liu G, Ren X, Li Y, Li H. Midkine promotes kidney injury in diabetic kidney disease by increasing neutrophil extracellular traps formation. *Ann Transl Med*. 2022 Jun;10(12):693. doi: 10.21037/atm-22-2382. PMID: 35845498; PMCID: PMC9279803.
 190. Cao S, Li B, Yi X, Chang B, Zhu B, Lian Z, Zhang Z, Zhao G, Liu H, Zhang H. Effects of exercise on AMPK signaling and downstream components to PI3K in rat with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2012;7(12):e51709. doi: 10.1371/journal.pone.0051709. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23272147; PMCID: PMC3521695.
 191. Sharma A, Aruna D, Beatrice A. A Study to Evaluate the Effect of Sodium-Glucose Co-transporter 2 (SGLT2) Inhibitors on Oxidative Stress Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Cureus*. 2024 Apr 18;16(4):e58536. doi: 10.7759/cureus.58536. PMID: 38765344; PMCID: PMC11101606.
 192. Lee YS, Li P, Huh JY, Hwang IJ, Lu M, Kim JI, Ham M, Talukdar S, Chen A, Lu WJ, Bandyopadhyay GK, Schwendener R, Olefsky J, Kim JB. Inflammation is

- necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2011 Oct;60(10):2474-83. doi: 10.2337/db11-0194. Epub 2011 Sep 12. PMID: 21911747; PMCID: PMC3178297.
193. Molanouri Shamsi M, Hassan ZH, Gharakhanlou R, Quinn LS, Azadmanesh K, Baghersad L, Isanejad A, Mahdavi M. Expression of interleukin-15 and inflammatory cytokines in skeletal muscles of STZ-induced diabetic rats: effect of resistance exercise training. *Endocrine*. 2014 May;46(1):60-9. doi: 10.1007/s12020-013-0038-4. Epub 2013 Sep 6. PMID: 24006180.
 194. Pattamaprapanont P, Muanprasat C, Soodvilai S, Srimaroeng C, Chatsudthipong V. Effect of Exercise Training on Signaling of Interleukin-6 in Skeletal Muscles of Type 2 Diabetic Rats. *Rev Diabet Stud*. 2016 Summer-Fall;13(2-3):197-206. doi: 10.1900/RDS.2016.13.197. Epub 2016 Aug 10. PMID: 28012283; PMCID: PMC5553767.
 195. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondou N, Shaw W, Law G, Desai M, Matthews DR; CANVAS Program Collaborative Group. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017 Aug 17;377(7):644-657. doi: 10.1056/NEJMoa1611925. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28605608.
 196. Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, Silverman MG, Zelniker TA, Kuder JF, Murphy SA, Bhatt DL, Leiter LA, McGuire DK, Wilding JPH, Ruff CT, Gause-Nilsson IAM, Fredriksson M, Johansson PA, Langkilde AM, Sabatine MS; DECLARE–TIMI 58 Investigators. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2019 Jan 24;380(4):347-357. doi: 10.1056/NEJMoa1812389. Epub 2018 Nov 10. PMID: 30415602.

197. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Aug 5;11(9):607-15. doi: 10.1038/nri3041. PMID: 21818123.
198. Zhang R, Xie Q, Lu X, Fan R, Tong N. Research advances in the anti-inflammatory effects of SGLT inhibitors in type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr.* 2024 May 12;16(1):99. doi: 10.1186/s13098-024-01325-9. PMID: 38735956; PMCID: PMC11089742.
199. Tanaka K, Takahashi H, Katagiri S, Sasaki K, Ohsugi Y, Watanabe K, Rasadul IMD, Mine K, Nagafuchi S, Iwata T, Eguchi Y, Anzai K. Combined effect of canagliflozin and exercise training on high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2020 Apr 1;318(4):E492-E503. doi: 10.1152/ajpendo.00401.2019. Epub 2020 Feb 4. PMID: 32017594.
200. Layne AS, Nasrallah S, South MA, Howell ME, McCurry MP, Ramsey MW, Stone MH, Stuart CA. Impaired muscle AMPK activation in the metabolic syndrome may attenuate improved insulin action after exercise training. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jun;96(6):1815-26. doi: 10.1210/jc.2010-2532. Epub 2011 Apr 20. PMID: 21508135; PMCID: PMC3100747.
201. Zheng L, Rao Z, Guo Y, Chen P, Xiao W. High-Intensity Interval Training Restores Glycolipid Metabolism and Mitochondrial Function in Skeletal Muscle of Mice With Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Aug 14;11:561. doi: 10.3389/fendo.2020.00561. PMID: 32922365; PMCID: PMC7456954.
202. Wang H, Gao L, Zhao C, Fang F, Liu J, Wang Z, Zhong Y, Wang X. The role of PI3K/Akt signaling pathway in chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol.* 2024

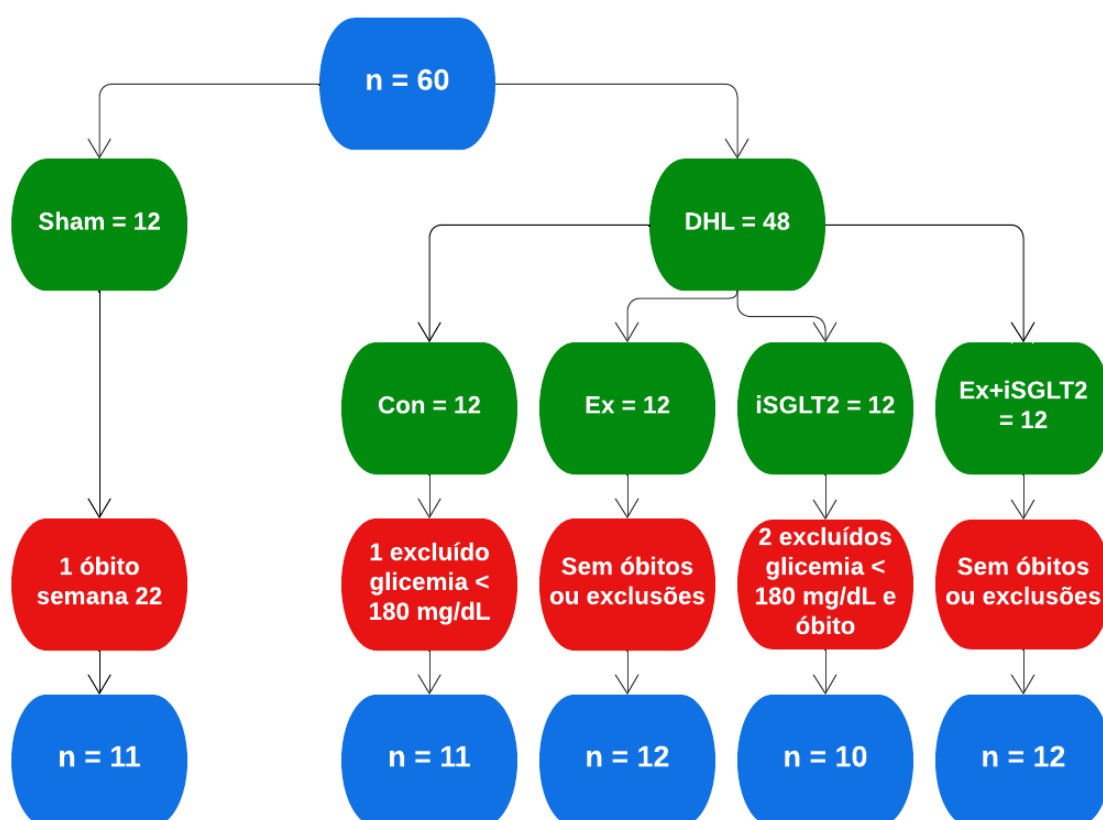
Aug;56(8):2623-2633. doi: 10.1007/s11255-024-03989-8. Epub 2024 Mar 18. PMID: 38498274.

203. Hudkins KL, Li X, Holland AL, Swaminathan S, Alpers CE. Regression of diabetic nephropathy by treatment with empagliflozin in BTBR ob/ob mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2022 Apr 25;37(5):847-859. doi: 10.1093/ndt/gfab330. PMID: 34865099.
204. Bray JJH, Foster-Davies H, Stephens JW. A systematic review examining the effects of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors (SGLT2is) on biomarkers of inflammation and oxidative stress. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020 Oct;168:108368. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108368. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32800932.

11 MATERIAL SUPLEMENTAR

Dentre as análises moleculares por meio do Western Blotting, buscou-se, através das proteínas glicogênio sintase quinase-3 – GSK-3, sirtuína 1 – SIRT1, coativador 1-alfa do Receptor gama – PGC1- α e alvo mamífero da rapamicina – mTOR, um melhor entendimento do mecanismo geral de sinalização da glicose e insulina. Entretanto, por dificuldades metodológicas, não foi obtido o ‘n’ minimamente necessário para as suas utilizações.

Abaixo encontra-se o fluxograma que demonstra o número de animais no início e ao final do estudo. Após a divisão entre dieta padrão (Sham) e dieta hiperlipídica (DHL), um animal do grupo Sham foi a óbito na 22ª semana (n=1). Um outro animal do grupo Con foi excluído por apresentar glicemia < 180 mg/dL após a introdução de estreptozotocina (STZ) (n=1), enquanto dois animais do grupo iSGLT2 foram excluídos **por apresentar** glicemia < 180 mg/dL após a introdução da STZ (n=1) e por óbito após o uso de STZ (n=1), respectivamente.



Ainda enquanto material suplementar, encontra-se outra tese de doutorado desenvolvida como parte deste estudo, e que objetivou analisar o perfil renal da mesma população utilizada.

12 CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1403

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO - UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.018158/2021-09

APROVADO/APPROVAL: 27/04/2021 – R.O. 03/2021

TÍTULO: O papel do co-transportador de sódio-glicose 2 e do exercício físico na regulação do sistema redox e do complexo inflamassoma em animais com nefropatia diabética experimental.

TITLE: The role of sodium-glucose cotransporter-2 and physical exercise on redox system and inflammasome complex in the experimental diabetic nephropathy.

AUTORES/AUTHORS: Luiz Claudio Fernandes, Ricardo Aurino Pinho, Paulo André Bispo Machado Junior, Franciane TF Vasconcelos, Luis Felipe Beltrão Marqueze.

DEPARTAMENTO/DEPARTAMENT: Fisiologia

Prof. Dr. Breno Castello Branco Beirão
Coordenador da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI**, Institucional, em 07/07/2021, às 15:26, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **BRENO CASTELLO BRANCO BEIRAO**, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR, em 09/08/2021, às 19:38, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **3636692** e o código CRC **6A360CC2**.