



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO MULTIDICCIPLINAR EM SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**ERIKA AZENATHE BARROS MERCÊS**

**COMPARAÇÃO ENTRE O TREINAMENTO  
INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE E  
TREINAMENTOS CONTÍNUOS SOBRE A  
SINALIZAÇÃO DE KLOTHO/NRF2 E O ESTADO REDOX  
RENAL EM RATAS COM NEFROTOXICIDADE INDUZIDA  
POR CISPLATINA**

Vitória da Conquista, BA

2024

**ERIKA AZENATHE BARROS MERCÊS**

**COMPARAÇÃO ENTRE O TREINAMENTO  
INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE E  
TREINAMENTOS CONTÍNUOS SOBRE A  
SINALIZAÇÃO DE KLOTHO/NRF2 E O ESTADO REDOX  
RENAL EM RATAS COM NEFROTOXICIDADE INDUZIDA  
POR CISPLATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lilianny Sousa de Brito Amaral  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2024

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

M554

Mercês, Erika Azenathe Barros.

Comparação entre o treinamento intervalado de alta intensidade e treinamentos contínuos sobre a sinalização de klotho/NRF2 e o estado redox renal em ratas com nefrotoxicidade induzida por cisplatina / Erika Azenathe Barros Mercês. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2024.

54 f.; il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilianny Sousa de Brito Amaral.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociências) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2024.

1. Nefrotoxicidade. 2. Cisplatina. 3. Exercício físico. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Amaral, Lilianny Sousa de Brito. III. Título.

CDU: 616.61

**ÉRIKA AZENATHE BARROS MERCÊS**

**COMPARAÇÃO ENTRE O TREINAMENTO  
INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE E  
TREINAMENTOS CONTÍNUOS SOBRE A  
SINALIZAÇÃO DE KLOTHO/NRF2 E O ESTADO REDOX  
RENAL EM RATAS COM NEFROTOXICIDADE INDUZIDA  
POR CISPLATINA**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista – BA, 2024.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liliany Sousa de Brito Amaral  
Instituto Multidisciplinar de Saúde  
Universidade Federal da Bahia

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma de Jesus Soares  
Instituto Multidisciplinar de Saúde  
Universidade Federal da Bahia

---

Prof. Dr. Thiago Macêdo Lopes Correia  
Centro Universitário UniFG -  
Campus Brumado

À Deus, fonte de sabedoria e entendimento.

Aos meus queridos pais pelo amor, cuidado e apoio.

À Lilianny pela dedicação, paciência e por todo conhecimento compartilhado.

## AGRADECIMENTOS

Assim como numa corrida, minha jornada acadêmica foi uma prova de resistência, determinação e superação. Desde a ansiosa largada, enfrentei desafios que exigiram persistência. Cada etapa representou um novo obstáculo a ser superado, e cada quilômetro percorrido foi uma vitória conquistada. Ao cruzar essa linha de chegada, olho para trás com gratidão e admiração pela jornada que percorri. Houve momentos de passos curtos e longas subidas que foram encorajados por pessoas marcantes nessa trajetória, por isso agradeço:

Ao meu amado Deus pela força e pela graça que me sustentaram. Pela sabedoria e pelo amor com que tem me guiado durante toda minha vida, abrindo portas nos momentos certos para que eu possa prosseguir sempre.

Aos meus pais, que sempre foram os meus maiores apoiadores e incentivadores, dedico uma imensa gratidão. Por todo amor e encorajamento e pelas orações para que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha jornada.

À minha orientadora Lilianny, expresso minha sincera gratidão. Seu comprometimento, dedicação e paciência. Suas orientações, sempre ditadas com voz doce, foram luz guiando o caminho. Sua inteligência e amor pelo ensino transformou cada oportunidade em aprendizado e crescimento tornando-se exemplo inspirador em minha vida. Sou imensamente grata a Deus por me permitir tê-la como mentora.

Aos colegas do grupo de pesquisa agradeço a colaboração imprescindível em cada etapa desta jornada. Juntos enfrentamos desafios, compartilhamos ideias e celebramos sucessos. Agradeço principalmente a Fernanda, Lara e Carol, pelo apoio, disposição e compreensão mútuos. Nossa amizade, conversas e risadas compartilhadas nos fizeram ir mais longe e deixar esse caminho tão mais leve. Expresso também minha profunda gratidão ao colega e colaborador Thiago Macêdo por toda sua gentileza, compartilhando com tanto empenho, paciência e de forma brilhante seu conhecimento.

Agradeço também às agências de fomento, CNPq e Fapesb, cujo generoso apoio financeiro foi fundamental para viabilizar este projeto.

A todos, minha sincera gratidão.

*“Não que, por nós mesmos, sejamos capazes  
de pensar alguma coisa, como se partisse de nós;  
pelo contrário, a nossa suficiência vem de Deus.”  
(2 Coríntios 3:5)*

MERCÊS, E. A. B. Comparação entre o treinamento intervalado de alta intensidade e treinamentos contínuos sobre a sinalização de klotho/Nrf2 e o estado redox renal em ratas com nefrotoxicidade induzida por cisplatina. Dissertação (Mestrado) - Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

## RESUMO

A cisplatina (cis-diamminedichloroplatinum II, CDDP) é um agente quimioterápico utilizado no tratamento de uma grande variedade de tumores sólidos. No entanto, o seu uso é limitado pela nefrotoxicidade, a qual culmina em injúria renal aguda (IRA). O estresse oxidativo e nitrosativo são os principais mecanismos envolvidos na nefrotoxicidade induzida pela CDDP. O treinamento físico pode promover efeitos antioxidantes por meio da ativação de vias de sinalização, como é o caso da via Klotho/Nrf2. Entretanto, ainda não é bem estabelecido os efeitos da manipulação de variáveis do treinamento, como intensidade, sobre tais efeitos antioxidantes. Dessa forma, este estudo tem como objetivo comparar os efeitos do treinamento de baixa (LIT), moderada (MIT) e alta intensidade intervalada (HIIT) sobre o estado redox renal, através da modulação da via de sinalização Klotho/Nrf2, de ratas com IRA induzida por CDDP. Para tanto, ratas Wistar foram divididas em cinco grupos (n=7): controle sedentário (C+S); CDDP e sedentário (CDDP+S); CDDP e submetido ao LIT (CDDP+LIT); CDDP e submetido ao MIT (CDDP+MIT); e CDDP e submetido ao HIIT (CDDP+HIIT). Os protocolos de treinamento foram realizados em esteira motorizada durante 8 semanas. Após este período, administramos uma única injeção de CDDP (5 mg/kg), ou solução salina, para indução da IRA. Sete dias após a injeção de CDDP, as ratas foram introduzidas em gaiolas metabólicas para a coleta de amostras de urina de 24h, e em seguida elas foram eutanasiadas para a coleta dos rins e sangue do tronco. Foram analisados a função tubular, através da fração de excreção (FE) de eletrólitos; a estrutura tubular; marcadores de lesões nitro oxidativas às macromoléculas celulares (lipídios, proteínas e DNA); os níveis e atividade de enzimas antioxidantes e a expressão de  $\alpha$ -Klotho e Nrf2 no tecido renal. Nossos dados demonstram que a CDDP causou perda da borda em escova e redução da função reabsortiva dos túbulos renais, reduziu a expressão de klotho e aumentou marcadores de dano oxidativo e nitrosativo às macromoléculas celulares, como lipídios (4-HNE e TBARS), proteínas (proteínas carbolinadas e 3-NT) e DNA (8-OHDG). No entanto, os protocolos de treinamento foram capazes de reduzir todas essas alterações de uma maneira dependente da intensidade e, portanto, com efeitos mais



proeminentes com o HIIT. Nossos protocolos de treinamento também potencializaram as defesas antioxidantes renais, apresentando aumento da expressão das enzimas antioxidantes (SOD-1, catalase e GPx) e aumento da atividade enzimática (catalase e GPx). Tais efeitos podem ter sido, pelo menos em parte, mediados pela ativação da via Nrf2, também de maneira dependente da intensidade. Como conclusão, nossos resultados sugerem que o HIIT promoveu efeitos renoprotetores mais pronunciados do que LIT e MIT, melhorando o estado redox através da ativação da via de sinalização Klotho/Nrf2 em ratas com nefrotoxicidade induzida por CDDP.

Palavras-chave: Nefrotoxicidade, Cisplatina, Treinamento físico, HIIT, estado redox, Klotho.

MERCÊS, E. A. B. Comparison between high-intensity interval training and continuous training on Klotho/Nrf2 signaling and renal redox state in rats with cisplatin-induced nephrotoxicity. Dissertation (Master's) - Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

## ABSTRACT

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II, CDDP) is a chemotherapy agent used to treat various solid tumors. However, its use is limited by nephrotoxicity, which culminates in acute kidney injury (AKI). Oxidative and nitrosative stress are the main mechanisms involved in CDDP-induced nephrotoxicity. Exercise training can promote antioxidant effects by activating signaling pathways, such as the Klotho/Nrf2 pathway. However, the effects of manipulating training variables, like intensity, on these antioxidant effects are not yet well established. Therefore, this study aims to compare the effects of low (LIT), moderate (MIT), and high-intensity interval training (HIIT) on the renal redox state through modulation of the signaling pathway Klotho/Nrf2 of rats with CDDP-induced AKI. To this end, Wistar rats were divided into five groups (n=7): sedentary control (C+S); CDDP and sedentary (CDDP+S); CDDP and submitted to LIT (CDDP+LIT); CDDP and submitted to MIT (CDDP+MIT); and CDDP and submitted to HIIT (CDDP+HIIT). The training protocols were carried out on a motorized treadmill for 8 weeks. After this period, we administered a single injection of CDDP (5 mg/kg), or saline solution, to induce AKI. Seven days after the CDDP injection, the rats were introduced into metabolic cages to collect 24-hour urine samples, and then they were euthanized to collect kidneys and trunk blood. The tubular function was analyzed through the excretion fraction (EF) of electrolytes; the tubular structure; markers of nitro-oxidative lesions to cellular macromolecules (lipids, proteins, and DNA); the levels and activity of antioxidant enzymes, and the expression of  $\alpha$ -Klotho and Nrf2 in kidney tissue. Our data demonstrate that CDDP caused loss of the brush border and reduced reabsorptive function of renal tubules, reduced klotho expression, and increased markers of oxidative and nitrosative damage to cellular macromolecules, such as lipids (4-HNE and TBARS), proteins (carbonylated proteins and 3- NT) and DNA (8-OHDG). However, training protocols were able to reduce all these changes in an intensity-dependent manner and, therefore, with more prominent effects with HIIT. Our training protocols also enhanced renal antioxidant defenses, showing increased expression of antioxidant enzymes (SOD-1, catalase, and GPx) and increased enzymatic activity (catalase and GPx). Such effects may have been, at least in part, mediated by the activation of the Nrf2

pathway, also in an intensity-dependent manner. In conclusion, our results suggest that HIIT promoted more pronounced renoprotective effects than LIT and MIT, improving the redox state by activating the Klotho/Nrf2 signaling pathway in rats with CDDP-induced nephrotoxicity.

Keywords: nephrotoxicity, cisplatin, exercise training, HIIT, redox state, Klotho.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>17</b>
2.1 Epidemiologia e definição de Injúria Renal Aguda	17
2.2 Caracterização da IRA induzida por cisplatina	17
2.3 Mecanismos fisiopatológicos da IRA induzida por cisplatina	19
2.3.1 Captação celular e conversão da cisplatina em nefrotoxinas	20
2.3.2 Estresse oxidativo e nitrosativo	20
2.3.3 Ativação de vias inflamatórias e apoptóticas	23
2.4 A influência dos hormônios sexuais femininos na IRA induzida por cisplatina	24
2.5 Efeitos do treinamento aeróbico sobre o estresse oxidativo na injúria renal aguda induzida por cisplatina	25
2.6 Adaptações fisiológicas induzidas pelo HIIT em diferentes órgãos e modelos experimentais	27
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>30</b>
4.1 Animais e Protocolo experimental	30
4.2 Teste de corrida máxima	31
4.3 Protocolo de treinamento	31
4.4 Dosagens de Eletrólitos: Sódio, Potássio, Cálcio e Magnésio	32
4.5 Estudos Histopatológicos	32
4.6 Estudos Imuno-histoquímicos	33
4.7 Avaliação do Status Redox	33
4.7.1 Determinação da Concentração de Proteínas Totais	34

4.7.2 Peroxidação Lipídica	34
4.7.3 Proteínas carboniladas	34
4.7.4 Níveis de Oxido Nítrico (NO)	35
4.7.5 Atividade da Enzima Catalase (CAT)	36
4.7.6 Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase (GPx)	36
4.8 Extração de RNA e PCR em tempo real	37
4.9 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)	38
4.10 Análise Estatística	39
<b>5 REFERÊNCIAS</b>	<b>40</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cisplatina (cis-diamminedichloroplatinum II, CDDP) é um agente quimioterápico usado no tratamento de uma grande variedade de tumores sólidos, incluindo testicular, ovariano, mama, cabeça e pescoço, pulmão e mieloma múltiplo. Entretanto, a captação da CDDP pelas células tubulares renais promove acúmulo da droga nestas células, resultando em nefrotoxicidade e injúria renal aguda (IRA) em aproximadamente 30% dos pacientes em quimioterapia (Manohar; Leung, 2018; Holditch *et al.*, 2019).

A IRA induzida por CDDP é caracterizada por necrose tubular aguda da medula externa renal, especialmente do segmento S3 do túbulo proximal e do ramo ascendente espesso da alça de Henle, levando à perda da borda em escova, comprometimento abrupto da função renal e aumento da excreção urinária de eletrólitos (Lajer *et al.*, 2005; Francescato *et al.*, 2007; Francescato *et al.*, 2009). Embora os mecanismos fisiopatológicos sejam complexos e não totalmente compreendidos, o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e a atividade de enzimas antioxidantes estabelece um ambiente de pró-oxidativo, o qual promove danos estruturais às macromoléculas celulares, como lipídios, proteínas, DNA e organelas, levando à perda funcional e, eventualmente, à morte celular por apoptose e necrose (Chirino; Pedraza-Chaverri, 2009; Perse; Veceric-Haler, 2018; Manohar; Leung, 2018).

Ademais, é bem estabelecido que os hormônios sexuais femininos impactam na patogênese e progressão das doenças renais crônicas e agudas, essencialmente promovendo citoproteção (Silbiger; Neugarten, 1995; Dubey; Jackson, 2001; Straub, 2007). No entanto, no que diz respeito ao papel modulador desses hormônios sobre a IRA induzida por agentes nefrotóxicos, como a CDDP, os estudos apresentam resultados controversos, demonstrando ações renoprotetoras (Nematbakhsh *et al.*, 2013; Andrianova *et al.*, 2024), e aumentando o risco para agravamento das lesões (Pezeshki *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017; Jilanchi *et al.*, 2018). Diante disto, destaca-se a importância de novos estudos como este a fim de identificar potenciais estratégias terapêuticas adjuvantes voltadas também para a citoproteção no sexo feminino.

Até o momento, não existem terapias definitivas contra os efeitos nefrotóxicos induzidos pela CDDP. Por esse motivo, a comunidade científica tem buscado novas estratégias terapêuticas não-farmacológicas com vistas à prevenção da nefrotoxicidade, sem, contudo, reduzir as propriedades antitumorais da droga. Nesta perspectiva, extensas evidências demonstram que o exercício aeróbico regular promove adaptações benéficas em

múltiplos órgãos e sistemas (Pinckard *et al.*, 2019; Lavie *et al.*, 2015; Garber *et al.*, 2011; Gomez-Pinilla; Hillman, 2013; Machado, 2021). Alguns estudos demonstraram os efeitos renoprotetores do exercício aeróbico de intensidade moderada em ratos com IRA induzida por CDDP (Miyagi *et al.*, 2014; Zeynali *et al.*, 2015; Francescato *et al.*, 2018). No entanto, estudos investigando tais efeitos no sexo feminino são muito escassos. Além disso, ainda não está bem estabelecido quais os efeitos da manipulação de variáveis do treinamento, como modalidade e intensidade, sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos nas respostas renoprotetoras do treinamento aeróbico.

Recentemente, o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) tem sido investigado como alvo terapêutico para prevenção e tratamento de alguns modelos experimentais de doenças crônicas (Lu *et al.*, 2015; Ross *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2017). Além disso, estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa também demonstraram que o HIIT promoveu efeitos nefroprotetores superiores em comparação a treinamentos físicos aeróbicos tradicionais na atenuação da inflamação (Leite *et al.*, 2021) e regulação benéfica de vias de sinalização apoptóticas (Oliveira *et al.*, 2023) em ratas com IRA induzida por CDDP. No entanto, até onde sabemos, não há relatos que avaliem a modulação do HIIT sob vias de sinalização redox neste mesmo modelo experimental.

Klotho, identificado inicialmente como um gene anti-envelhecimento, é uma proteína multifuncional que existe nas formas solúvel secretada e transmembrana, esta última predominantemente expressa em células epiteliais tubulares renais (Matsumura *et al.*, 1998). A proteína transmembrana  $\alpha$ -Klotho, aqui referida simplesmente como Klotho, funciona como um co-receptor do fator de crescimento de fibroblastos 23 para modular a homeostase do fosfato e o metabolismo da vitamina D (Panesso *et al.*, 2014). Além desta função clássica, foi relatado que Klotho promove citoproteção por meio de ações antioxidantes, ativando a via de sinalização do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) e consequente aumento da transcrição de genes de enzimas antioxidantes, como a glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), catalase e heme oxigenase-1 (HO-1) (Cui *et al.*, 2018; Romero *et al.*, 2019; Xing *et al.*, 2021).

Interessantemente, embora as evidências da influência do exercício sobre a expressão de  $\alpha$ -Klotho sejam escassas, estudos demonstraram uma regulação positiva sobre os níveis solúveis desta proteína tanto em humanos (Saghiv *et al.*, 2017; Morishima *et al.*, 2021), quanto em animais experimentais (Phelps *et al.*, 2013). Por outro lado, foi relatado que os níveis renais de Klotho estavam significativamente diminuídos em modelos experimentais de doença renal aguda (Ning *et al.*, 2018; Ko *et al.*, 2019) e crônica (Shimizu *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2021). Tal observação levantou a possibilidade de o Klotho ser usado como um biomarcador (Hu; Moe, 2012) e como um agente renoprotetor em doenças renais, incluindo na IRA induzida por CDDP (Panesso *et al.*, 2014).

Portanto, diante da escassez de evidências científicas sobre o impacto da manipulação de variáveis do treinamento físico sobre a IRA induzida por CDDP no sexo feminino, o presente estudo propõe-se a comparar os efeitos do HIIT com os efeitos dos treinamentos contínuos de intensidades leve (LIT) e moderada (MIT) sobre o *status redox* renal e a modulação da sinalização klotho/Nrf2 em ratas wistar com IRA induzida por CDDP.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA E DEFINIÇÃO DE INJÚRIA RENAL AGUDA

A injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome clínica complexa de grande impacto na saúde pública, caracterizada por uma rápida redução da função renal e acúmulo de produtos residuais, como a ureia e creatinina (Ozkok; Edelstein, 2014). A IRA ocorre em 5 a 7,5% dos pacientes hospitalizados e em 50 a 60% dos pacientes críticos (Yoon *et al.*, 2022). Em unidades de terapia intensiva, 40% dos pacientes adultos e 82% dos pacientes pediátricos apresentam IRA (Hu; Moe, 2012). Estima-se que cerca de 2 milhões de pessoas no mundo morrem de IRA por ano e aqueles que sobrevivem possuem risco aumentado para o desenvolvimento de doença renal crônica (DRC) (Deng *et al.*, 2020). Ademais, além do aumento da morbimortalidade, há também uma associação entre a IRA e a doença renal terminal e doenças cardiovasculares (Kim *et al.*, 2022).

Quanto aos critérios de definição da IRA, o grupo Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) publicou uma diretriz que define a IRA como uma elevação de 0,3mg/dL na creatinina sérica basal dentro de 48h, aumento de 1,5 vezes nos níveis séricos de creatinina e/ou redução para valores menores do que 0,5 ml/kg do débito urinário durante 6h (KDIGO, 2012). Adicionalmente, de acordo com sua etiologia, a IRA pode ser classificada em pré-renal, intrínsecas e pós-renal. As lesões pré-renais ocorrem principalmente devido a hipoperfusão renal, como resultado secundário ao uso de medicamentos e condições sistêmicas; as lesões intrínsecas representam condições em que há danos a componentes do sistema renal intrínseco, como a necrose tubular; finalmente, as lesões pós-renais são resultantes da obstrução do fluxo de urina, levando à hidronefrose e danos subsequentes ao parênquima renal (Mc Daniel; Bentley, 2015). Dentre as principais causas de IRA estão a sepse, hemorragias, distúrbios hematológicos, isquemia por hipoperfusão e efeitos adversos farmacológicos (Mercado *et al.*, 2019; Malheiro *et al.*, 2024).

### 2.2 CARACTERIZAÇÃO DA IRA INDUZIDA POR CISPLATINA

A cisplatina (cis-diamminedichloroplatinum II - CDDP) é um quimioterápico antineoplásico a base de platina, amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de tumores sólidos, tais como cabeça, pescoço, pulmão, bexiga, testículo, mama e ovário (Liu *et al.*, 2018; Volarevic *et al.*, 2019; Holditch *et al.*, 2019). Também é utilizada em terapias combinadas para tratar cânceres de alto grau, como osteossarcoma e cânceres de tecidos moles, incluindo carcinoma de células escamosas (McSweeney *et al.*, 2021). Sua atividade antineoplásica baseia-se na capacidade de se ligar ao DNA genômico (gDNA) ou DNA mitocondrial (mtDNA) e gerar lesões, bloquear a produção de DNA, mRNA e proteínas, interromper a replicação do DNA e ativar vias de transdução de sinais que levam à apoptose ou necrose (Gosh, 2019). Além disso, a CDDP também promove disfunção mitocondrial e afeta a sinalização de cálcio no retículo endoplasmático, o que também culmina em ativação de vias apoptóticas (Leung; Manohar 2018). Apesar da sua alta eficácia terapêutica, o uso deste quimioterápico é limitado principalmente pelos efeitos tóxicos gerados nos tecidos saudáveis, incluindo a hepatotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade e nefrotoxicidade (Crona *et al.*, 2017; George *et al.*, 2020; Volarevic *et al.*, 2019). Dentre todos esses efeitos adversos, a nefrotoxicidade representa o de maior gravidade, constituindo um fator limitante para a terapia anticâncer devido ao desenvolvimento da IRA (Meng *et al.*, 2017).

Estima-se que 30% dos pacientes tratados com CDDP desenvolvem insuficiência renal aguda (IRA) a despeito de medidas preventivas comuns, como hidratação com solução salina e suplementação com magnésio (Crona *et al.*, 2017; George *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2022). Outras abordagens potenciais, incluindo o uso de antioxidantes e bloqueadores do transporte de CDDP testados em estudos com animais, também não têm demonstrado eficácia ideal na prevenção da IRA (Panesso *et al.*, 2014).

Os rins são particularmente vulneráveis à toxicidade da CDDP devido ao fato de sua excreção ocorrer predominantemente pela via urinária. Durante tal processo, a droga é acumulada nas células tubulares, podendo chegar a uma concentração cinco vezes mais alta que a do sangue (Oliveira *et al.*, 2024; Peres; Junior, 2013, Volarevic *et al.*, 2019). Assim, a nefrotoxicidade é resultante principalmente do acúmulo da CDDP nas células tubulares, seguida por sua conversão em metabólitos tóxicos, os quais desencadeiam lesões por múltiplas vias (Peres; Junior, 2013; Oh *et al.*, 2014). Tais lesões ocorrem primariamente nos túbulos proximais, particularmente no segmento S-3, sendo os túbulos distais e ramo ascendente

espesso da alça de Henle afetados em menor grau e mais tardiamente (Peres; Junior, 2013). O padrão histopatológico da IRA é marcado por achatamento das células tubulares, dilatação da luz tubular, perda da borda em escova do túbulo proximal, alterações vacuolares degenerativas, debris intratubulares, cilindros pigmentados e necrose (Leite *et al.*, 2021).

As alterações histológicas são frequentemente acompanhadas por um declínio da função renal, com queda abrupta da taxa de filtração glomerular (TFG), e consequente aumento dos níveis séricos de creatinina e nitrogênio ureico (Leite *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2023). Adicionalmente, as funções absorptivas dos túbulos proximais são altamente prejudicadas, pois a CDDP afeta a integridade do citoesqueleto e a polaridade celular, interfere nos sistemas de transporte de água e eletrólitos das membranas apical e basolateral, especialmente na bomba Na/K/ATPase, co-transportadores de Na/K/2Cl, permutador tipo III do Na/H e aquaporinas (canais de água), resultando em distúrbios hidroeletrólíticos graças ao aumento fracional da excreção de sódio, potássio, cálcio e magnésio (Lajer *et al.*, 2005; Francescato *et al.*, 2009)

### 2.3 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA IRA INDUZIDA POR CISPLATINA

Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes às lesões nefrotóxicas induzidas pela CDDP são complexos e não totalmente compreendidos. Contudo, a literatura científica ressalta que a toxicidade resulta do acúmulo tubular da droga, conversão intracelular em nefrotoxinas e ativação de diversas vias de sinalização. Tais eventos, por sua vez, deflagram danos ao DNA, disfunções mitocondriais, estresse nitro-oxidativo, inflamação e ativação de vias apoptóticas (Pabla; Dong, 2008; Quintanilha *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2024).

Parece que o estresse oxidativo assume um papel protagonista das disfunções celulares, especialmente mitocondriais, graças ao acúmulo exacerbado de espécies reativas a oxigênio (ERO) (Ozkok; Edeltein, 2014; Tanase *et al.*, 2019, Oliveira *et al.*, 2024). Assim, as lesões teciduais e dessas ERO promovem ativação de diversas vias de sinalização pró-inflamatórias e pró-apoptóticas, relacionadas ao agravamento e progressão das lesões (Oliveira *et al.*, 2024). Nesta seção, abordaremos os principais aspectos fisiopatológicos relacionados ao estresse nitro- oxidativo, além de ressaltar brevemente sua interação com as principais vias inflamatórias e apoptóticas.

### 2.3.1 CAPTAÇÃO CELULAR E CONVERSÃO DA CISPLATINA EM NEFROTOXINAS

A CDDP é transportada para dentro das células de diversos tecidos passivamente e principalmente por meio de transportadores de membrana, como o transportador de cobre 1 (CTR1) e 2 (CTR2), o transportador de extrusão de múltiplas drogas e toxinas 1 (MATE1), ATPases de transporte de cobre e transportadores de cátions orgânicos (OCTs) (Oliveira *et al.*, 2024, Boran *et al.*, 2019; Ozkok; Edelstein, 2014). Inicialmente, a CDDP é hidrolisada e conjugada à glutathione reduzida (GSH) no fígado pela ação da enzima glutathione S-transferase (GST). O conjugado de glutathione é então excretado pelos hepatócitos para a corrente sanguínea, distribuindo-se pelos tecidos do corpo (Oliveira *et al.*, 2024). Após os conjugados CDDP-GSH serem filtrados e secretados dentro do lúmen do túbulo proximal, eles serão metabolizados pelas enzimas gama-glutamyltransferase (GGT) e N-aminotransferase, localizadas na borda em escova do túbulo proximal, formando os conjugados cisteinil-glicina e cisteína-S, respectivamente. O conjugado cisteína-S é então reabsorvido pelo túbulo proximal e finalmente metabolizado pela enzima beta-liase, gerando um metabólito altamente reativo com os compostos tiol/platina, que interagem com macromoléculas celulares conduzindo eventualmente aos efeitos nefrotóxicos e à morte das células renais (Oliveira *et al.*, 2024, Ozkok; Edelstein, 2014).

### 2.3.2 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO

As nefrotoxinas geradas pelo metabolismo da CDDP no túbulo proximal também reagem rapidamente com moléculas antioxidantes contendo tiol (Ozkok; Edelstein, 2014), reduzindo a atividade local de várias enzimas antioxidantes, incluindo a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) (Holditch *et al.*, 2019). A SOD possui a função de catalisar a distribuição de ânions superóxido para peróxido de hidrogênio, enquanto a CAT e GPx catalisam peróxido de hidrogênio formando oxigênio e água (Deng *et al.*, 2020). A CDDP também ativa a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a hexoquinase, as quais, além de reduzir a produção antioxidante, aumentam a produção de radicais livres (Oh *et al.*, 2014). Ademais, a CDDP age alterando a função mitocondrial, modificando os parâmetros de manutenção da função dessa organela e interrompendo a ação dos complexos mitocondriais,

resultando em desacoplamento mitocondrial, aumento da produção de ERO e diminuição da produção de ATP (Holditch *et al.*, 2019). Desta forma, o estresse oxidativo é consequência do acúmulo exacerbado de ERO e da baixa atividade do sistema antioxidante endógeno.

A reação das ERO com os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares promove a peroxidação lipídica, tendo como principal produto o malondialdeído (MDA) (Dodson *et al.*, 2019). Além disso, as ERO causam danos oxidativos às proteínas através da carbonilação, produzindo formação de agregados proteicos suscetíveis à degradação proteolíticas, quando alguns aminoácidos serão convertidos em derivados carbonil. As proteínas que sofrem dano oxidativo precisam ser reparadas, no entanto, se isso não for possível, elas serão degradadas e eliminadas para minimizar efeitos negativos às células. O acúmulo dessas proteínas oxidadas agrava ainda mais as lesões teciduais (Dalle- Donne *et al.*, 2003). O aumento das ERO também acarreta níveis aumentados do 8-OHdG (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina), marcador importante de danos ao DNA, formado pelas reações dos radicais livres com bases de guanina (Dogan *et al.*, 2022).

A CDDP desregula várias vias de sinalização, incluindo a do fator de transcrição nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2) e da enzima microsomal heme oxigenase-1 (HO-1), o que também contribui para o desenvolvimento de danos significativos à estrutura e funções celulares, ativação de vias apoptóticas, morte celular e danos ao DNA (Holditch *et al.*, 2019; Karasawa; Steyger, 2015; Ozkok; Edelstein, 2014; Sun *et al.*, 2018). O Nrf2 é considerado o principal regulador da resposta antioxidante, uma vez que regula a expressão de mais de 200 genes citoprotetores, incluindo enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPx (Almeida *et al.*, 2022). Em condições fisiológicas, este fator encontra-se em baixos níveis e ancorado no citoplasma pela proteína 1 associada à ECH semelhante a Kelch (Keap1) (Wangg *et al.*, 2023). Diante do estresse oxidativo, há dissociação desse complexo e liberação da Nrf2, o qual é translocado para o núcleo para regular a transcrição de genes contendo elemento de resposta antioxidante (ARE) e ativar enzimas antioxidantes (Dodson *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023) que atuarão na eliminação de radicais livres com vistas à manutenção da homeostase celular (Deng *et al.*, 2020). Ademais, o Nrf2 está relacionado com a indução de HO-1, a qual é conhecida como uma proteína de choque térmico induzível cujo nível é elevado sob estímulos externos, como estresse oxidativo e inflamação (Wang *et al.*, 2023). Tal enzima atua catalisando a degradação do grupamento heme em biliverdina, ferro e monóxido de carbono e é ativada no

rim pelo tratamento com CDDP como uma resposta compensatória ao insulto celular (Ozkok; Edelstein, 2014).

Além do estresse oxidativo, o estresse nitrosativo também desempenha um papel significativo na nefrotoxicidade induzida por CDDP. A CDDP aumenta a expressão da proteína óxido nítrico sintase (NOS), contribuindo para o aumento da produção de óxido nítrico (NO). O conteúdo renal de nitrato/nitrito total está aumentado em ratos tratados com CDDP, sugerindo que a produção de NO encontra-se aumentada nestes animais (Chirino *et al.*, 2004). Sob condições de estresse, o radical superóxido reage com o NO dando origem à formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN), tal como o ânion peroxinitrito (ONOO-) (Karasawa; Steyger, 2015). O ONOO-, molécula altamente oxidante e instável, por sua vez, decompõe-se em outras moléculas reativas a oxigênio, como o dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) e o radical hidroxila (OH), além de reagir com resíduos de tirosina das proteínas formando assim a nitrotirosina (Meng *et al.*, 2017). Em níveis baixos, o peroxinitrito modula várias vias de sinalização intracelulares, contudo, em concentrações elevadas exerce efeitos citotóxicos, levando ao estresse nitro-oxidativo, pois é capaz de oxidar lipídios, tióis e DNA (Szabo, 2007). Assim, tanto as ERO quanto as ERN atuam em vários alvos celulares, orquestrando as lesões citotóxicas tubulares induzidas pela CDDP (Karasawa; Steyger, 2015; Tuan *et al.*, 2015).

Klotho, inicialmente conhecido por sua ação antienvhecimento, é uma proteína multifuncional existente nas formas solúvel e transmembrana sendo altamente expressa nas células epiteliais tubulares renais (Martsumura *et al.*, 1998). Atua como co-receptor do fator de crescimento de fibroblastos 23, modulando a homeostase do fosfato e o metabolismo da vitamina D (Hu; Moe, 2012; Panesso *et al.*, 2014). Além disso, o Klotho exerce papel na citoproteção por meio de ações antioxidantes e antiapoptóticas, ativando a via de sinalização do Nrf2 e suprarregulando a expressão de genes de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e HO-1 (Cui *et al.*, 2018; Romero *et al.*, 2019; Xing *et al.*, 2021). Atua também inibindo o OCT2 e dessa forma diminuindo a captação de CDDP pelos túbulos renais (Hu; Moe, 2012; Panesso *et al.*, 2014). Assim, a ativação da via Klotho/Nrf2 constitui uma importante resposta de defesa celular ao acúmulo de ERO e ao estresse oxidativo.

Estudos experimentais demonstram que os níveis renais da proteína Klotho estão significativamente diminuídos tanto em modelos experimentais de doença renal aguda (Ning *et al.*, 2018; Ko *et al.*, 2019), quanto em modelos de doença crônica (Shimizu *et al.*, 2013; Xing

*et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2021). Estudos demonstram que a regulação negativa da expressão renal de Klotho está associada ao agravamento da lesão renal (Hu; Moe, 2012; Panesso *et al.*, 2014). Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à regulação negativa de Klotho na IRA são complexos e não totalmente compreendidos. Evidências sugerem que a deficiência renal de Klotho não está relacionada apenas à destruição do tecido renal em si, pois foi demonstrada uma redução de sua expressão antes mesmo de quaisquer alterações em outros marcadores de injúria renal em modelos experimentais de doenças renais (Mitobe *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2011; King *et al.*, 2012). Nesse sentido, é provável que citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo diminuam a expressão de Klotho pela modulação epigenética através da metilação ou desacetilação do promotor Klotho. Somado a isso, o membro 12 da superfamília do fator de necrose tumoral (TNFSF12, também conhecido com TWEAK) e o IFN- $\gamma$  possuem um papel determinante da redução dos níveis de mRNA e da proteína Klotho, além de recrutar células inflamatórias e induzir necrose regulada, amplificando dessa forma a lesão renal (Cuarental *et al.*, 2022).

### 2.3.3 ATIVAÇÃO DE VIAS INFLAMATÓRIAS E APOPTÓTICAS

O estresse oxidativo induzido pela CDDP está associado à ativação de vias pró-inflamatórias e pró-apoptóticas, as quais exercem um papel significativo na patogênese da injúria renal. Nesse sentido, estudos com animais experimentais demonstraram que as células epiteliais renais produzem vários mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , L-1- $\beta$ , IL-6, IL-18, IL-33 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), em resposta aos danos oxidativos induzidos pela CDDP (Ozkok; Edelstein, 2014; Leite *et al.*, 2021). Adicionalmente, tanto as ERO quanto o TNF- $\alpha$  promovem ativação do receptor toll-like 4, a qual induz a fosforilação e posterior translocação do fator de transcrição nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) para o núcleo, conduzindo à transcrição de mais mediadores inflamatórios, amplificando assim o processo pró-inflamatório local (Volarevic *et al.*, 2019; Leite *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2024). Além da via do NF- $\kappa$ B, outras vias inflamatórias também são ativadas, com é o caso do p38- MAPK, que irão contribuir para esse *status* pró-inflamatório local (Ozkok; Edelstein, 2014; Oliveira *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2024).

Notavelmente, a literatura também revela a participação fundamental das ERO na ativação de vias apoptóticas na IRA induzida por CDDP (Ozkok e Edelstein, 2014; Tanase *et al.*, 2019). Os danos oxidativos mitocondriais desencadeiam ativação da via intrínseca da apoptose, reduzindo as proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL e aumentando as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak (Oliveira *et al.*, 2023). O fator de transcrição p53 parece ter um papel central na amplificação do sinal pró-apoptótico, aumentando a relação Bax/Bcl-2 e ativando a caspase-3 (Ozkok; Edelstein, 2014; Oliveira *et al.*, 2023). Tal desbalanço entre as proteínas da família Bcl-2 promove o aumento da permeabilidade mitocondrial, culminando em extravasamento de fatores pró-apoptóticos, tais como o citocromo C e o fator indutor de apoptose (AIF) (Ozkok; Edelstein, 2014). Ademais, a via extrínseca da apoptose também é ativada via ativação dos receptores 1 e 2 do TNF (TNFR1 e TNFR2) que irão suscitar a apoptose por meio de uma cascata de ativação das caspases, finalmente clivando a caspase-8 e, posteriormente, a caspase-3, a qual gera condensação e fragmentação do DNA, deflagrando a morte celular (Ozkok; Edelstein, 2014; Oliveira *et al.*, 2023).

#### 2.4 A INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS NA IRA INDUZIDA POR CISPLATINA

Sabe-se que a CDDP é capaz de induzir nefrotoxicidade em ambos os sexos (Zamani *et al.*, 2014). Embora ao longo dos anos alguns pesquisadores tenham investigado a influência do gênero e dos hormônios sexuais sobre as doenças renais (Grzegorzczuk *et al.*, 2011; Conte *et al.*, 2023), ainda existem muitos conflitos sobre os impactos do sexo e o papel dos hormônios ovarianos sobre as lesões renais induzidas pela CDDP (Eshraghi-Jazi *et al.*, 2022). Assim, alguns estudos retratam o sexo feminino com um fator de risco para a IRA induzida por agentes nefrotóxicos (Holditch *et al.*, 2019; Karasawa; Steyger, 2015; Tanase *et al.*, 2019, Pezeshki *et al.*, 2013). Embora o mecanismo subjacente a este efeito não seja claro, algumas evidências apoiam-se no efeito vasodilatador do estrogênio, o qual contribuiria para uma maior quantidade de CDDP transportada para o rim, aumentando seu acúmulo no tecido renal, com consequente maior nefrotoxicidade e danos tubulares (Pezeshik *et al.*, 2013). Ademais, outros estudos também ressaltam que os hormônios sexuais femininos estão relacionados com a produção de NO, um potente vasodilatador. Nesse sentido, foi demonstrado que o estrogênio induz uma



maior produção de NO no sexo feminino via aumento da atividade da enzima NO sintase, ao passo que o bloqueio da síntese de NO reduziu os danos renais induzidos pela CDDP (Eshraghi- Jazi, 2011). Nematbakhsh e colaboradores (2017), em uma revisão narrativa acerca do tema, concluíram, com base em diversos estudos, que embora o sexo feminino envolva um menor risco para a nefrotoxicidade após a terapia com CDDP, níveis elevados de estrogênio podem aumentar o risco de toxicidade renal, recomendando, portanto, que a terapia com CDDP em mulheres seja realizada quando os níveis séricos deste hormônio não estejam tão elevados.

Por outro lado, outros estudos identificaram o sexo feminino como um fator renoprotetor contra a IRA induzida por CDDP. Nesse sentido, um estudo experimental comparando o grau da nefrotoxicidade induzida por CDDP entre ratos wistar machos e fêmeas constatou maiores níveis de BUN, creatinina, magnésio e MDA nos machos, indicando maiores danos renais em comparação com as fêmeas (Nematbakhsh *et al.*, 2013). Outro estudo analisou os níveis da excreção urinária de sódio em ratos wistar de ambos os sexos tratados com CDDP e indicou aumento significativo na excreção de sódio nos ratos machos, enquanto nas fêmeas esse aumento foi menos pronunciado (Stakisaitis *et al.*, 2010). Os autores deste estudo atribuíram tal efeito, em parte, à inibição da atividade da enzima NA-K-ATPase promovida pelos hormônios sexuais femininos, enquanto o hormônio sexual masculino aumenta a atividade desta enzima (Stakisaitis *et al.*, 2010). Outro fator que poderia estar relacionado com a menor nefrotoxicidade induzida por CDDP em fêmeas é a menor expressão de OTC2 nos rins em comparação com machos. Parece que os hormônios sexuais poderiam afetar a expressão de OTC2, uma vez que a testosterona aumentou a expressão deste transportador, enquanto o tratamento com estradiol reduziu sua expressão em animais experimentais (Eshraghi-Jazi *et al.*, 2022). Assim, é evidente que mais estudos são necessários para determinar os efeitos do sexo e hormônios sexuais sobre a IRA induzida por CDDP.

## 2.5 EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO NA INJÚRIA RENAL AGUDA INDUZIDA POR CISPLATINA

Diante da escassez de terapias farmacológicas específicas para a prevenção da IRA em paciente sob regimes terapêuticos envolvendo a CDDP, especialmente aqueles do sexo feminino, é notória a necessidade de estudos buscando identificar estratégias capazes de

contribuir para a prevenção da nefrotoxicidade. Sabe-se que o exercício físico regular promove adaptações benéficas em diferentes tecidos e órgãos, a nível celular e sistêmico, como a ativação de vias de sinalização redox e aumento da atividade e produção de enzimas antioxidantes, mostrando-se, portanto, uma intervenção não farmacológica promissora para melhorar as defesas antioxidantes renais e atenuar a nefrotoxicidade induzida pela CDDP (Almeida *et al.*, 2022; Malheiro *et al.*, 2024).

Nessa perspectiva, estudos experimentais têm demonstrado ações renoprotetoras mediadas pela prática regular de exercício físico aeróbico, em esteira motorizada, tanto em modelos de doenças renais crônicas (Kirkiman *et al.*, 2019; Tucker *et al.*, 2014; Amaral *et al.*, 2016), quanto de doenças renais agudas (Francescao *et al.*, 2018; Miyagi *et al.*, 2014). No que se diz a respeito à IRA induzida por CDDP, Francescato e colaboradores. (2018) observaram a melhora das alterações da função e estrutura renal em ratos submetidos a um programa de exercícios aeróbicos realizado previamente à indução de IRA por CDDP. Zeynali e colaboradores (2015) também apontaram reduções dos níveis renais de nitrito e dos níveis séricos de MDA em ratos que realizaram treinamento aeróbico moderado de 8 semanas, previamente à nefrotoxicidade induzida por CDDP. Miyagi e colaboradores (2014) observaram aumento da expressão gênica e dos níveis proteicos de HO-1 em camundongos com IRA induzida por CDDP submetidos a um programa de 8 semanas de exercícios em esteira, sugerindo que o exercício aumenta a expressão de HO-1 e consequentemente contribui para nefroproteção. Oliveira e colaboradores (2017), por sua vez, demonstraram que quatro semanas de exercício aeróbico moderado reduziram a concentração urinária de TBARS em ratos com IRA induzida por gentamicina. Almeida e colaboradores (2022) compararam os efeitos da natação forçada de baixa e alta intensidade, com frequência de três ou cinco vezes por semana, em camundongos com IRA induzida por CDDP, e descobriram que todos os protocolos de treinamento, independentemente da intensidade e frequência, reduziram os níveis de TBARS renal e aumentaram a atividade da peroxidase; entretanto, apenas o treinamento de baixa intensidade realizado três vezes por semana foi capaz de aumentar a atividade da enzima GPx, indicando que variáveis como tipo, frequência e intensidade do treinamento físico podem influenciar os efeitos renoprotetores. Outros estudos demonstram que o treinamento físico pode aumentar os níveis da proteína Klotho solúvel tanto em humanos (Savghiv *et al.*, 2017; Morishima *et al.*, 2021), quanto em animais experimentais

(Phelps *et al.*, 2013; Duan C *et al.*, 2022), entretanto, não há estudos que demonstrem o impacto de diferentes intensidades na expressão renal desta proteína.

As evidências do efeito renoprotetor do exercício na nefrotoxicidade induzida por CDDP são apresentadas nos estudos preponderantemente no sexo masculino. Quando se trata desse efeito em fêmeas, a conclusão ainda é incerta, visto a grande escassez de estudos. Nesse contexto, Noroozi e colaboradores (2015) apresentaram resultados conflitantes aos descritos anteriormente, com aumento da peroxidação lipídica em ratas tratadas com CDDP que realizaram exercícios físicos aeróbicos de intensidade moderada. Nesse estudo, as ratas foram submetidas a 8 semanas de exercícios aeróbicos em esteira motorizada, ao fim das quais o exercício não foi capaz de atenuar as alterações nos parâmetros de função renal e nem reduzir as lesões tubulointersticiais. De acordo com os autores deste estudo, tal resposta pode estar relacionada à presença dos hormônios sexuais femininos bem como às diferenças na hemodinâmica renal e na atividade do sistema renina-angiotensina na presença do exercício (Noroozi *et al.*, 2015). Dessa forma, nota-se a necessidade da realização de mais estudos para a melhor compreensão do impacto do exercício físico sobre a IRA, especialmente em fêmeas.

## 2.6 ADAPTAÇÕES FISIOLÓGICAS INDUZIDAS PELO HIIT EM DIFERENTES ÓRGÃOS E MODELOS EXPERIMENTAIS

Apesar dos estudos demonstrarem os efeitos benéficos do exercício aeróbico tradicional sobre a saúde em geral, nos últimos anos tem sido enfatizado que as adaptações celulares e metabólicas são altamente dependentes de variáveis do treinamento, como intensidade, modalidade e volume, sendo até mesmo um fator crítico para o alcance da citoproteção (Ramez *et al.*, 2019; Leite *et al.*, 2021; Almeida *et al.*, 2022). Dessa forma, atualmente há um crescente interesse em investigar os efeitos dos exercícios intervalados, como é o caso do treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT), sobre as adaptações fisiológicas em diferentes órgãos e condições patológicas. Entretanto, estudos que investiguem os efeitos desse tipo de treinamento sobre as doenças renais são extremamente escassos, e, até onde sabemos, não há estudos avaliando o impacto do HIIT sobre marcadores de estresse nitro-oxidativo renal no modelo experimental de nefrotoxicidade induzida por CDDP. Portanto, a fim de oferecer ao leitor um corpo de evidências científicas capazes de prever potenciais efeitos renoprotetores do HIIT

sobre o estresse nitro-oxidativo renal neste modelo experimental, descreveremos adiante os resultados de alguns estudos demonstrando os benefícios desta modalidade de treinamento sobre outros órgãos alvos em diferentes modelos experimentais.

O HIIT é uma modalidade de treinamento que consiste em sessões repetidas de exercícios intenso, geralmente em uma intensidade de >80%- 95% do consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2</sub>máx), ou >90% da frequência cardíaca máxima (FCmáx), intercaladas por curtos períodos de recuperação passiva (repouso) ou ativa (exercício de intensidade leve ou moderada) com duração maior ou igual a duas vezes a duração do exercício (MacInnis e Gibala, 2017; Dos Santos *et al.*, 2021). Estudos anteriores demonstraram que o HIIT promove melhora na saúde metabólica em diferentes populações, e tem sido eleito como uma intervenção benéfica para pacientes com doenças cardiovasculares (Wang *et al.*, 2021).

No que diz respeito à modulação do *status redox*, um estudo conduzido por Groussard *et al.* (2019) observou que o HIIT promoveu uma redução dos níveis de produtos da oxidação avançada de proteínas e aumento dos níveis de GPx no tecido muscular de ratos obesos. Lu *et al.* (2015) demonstraram benefícios superiores do HIIT em comparação ao exercício contínuo moderado na melhora da função cardíaca e redução do estresse oxidativo, reduzindo a concentração de MDA, aumentando as concentrações de SOD e GPx, além de atenuar a apoptose no tecido cardíaco em um modelo experimental de ratas pós infarto do miocárdio. Xu e colaboradores (2022) também demonstram a superioridade do HIIT sobre o treino contínuo de intensidade moderada em reduzir os níveis de MDA e aumentar a expressão proteica de Nrf2, HO-1 e outras enzimas antioxidantes no tecido testicular de ratos obesos submetidos a 8 semanas de treinamento. Interessantemente, Ramez e colaboradores (2019) observaram que o HIIT promoveu maior aumento do nível plasmático de Klotho e redução da área miocárdica infartada em comparação ao treino aeróbico contínuo moderado em ratos submetidos a 5 dias de treinamento físico prévio à lesão por isquemia reperfusão (Ramez *et al.*, 2019). Ademais, encontramos um único estudo conduzido por Tucker e colaboradores (2015) demonstrando que o HIIT foi mais eficaz do que o treino de baixa intensidade no aumento da expressão gênica das enzimas SOD1 e catalase em um modelo experimental de doença renal crônica induzida por nefrectomia. Em dois outros estudos, esse mesmo grupo de pesquisadores também apontaram que o HIIT foi mais efetivo em reduzir a expressão gênica de angiotensinogênio e aumentar a

expressão de genes relacionados ao reparo e à estabilidade genômica no mesmo modelo experimental (Tucker *et al.*, 2015; Tucker *et al.*, 2016).

Finalmente, em relação aos efeitos do HIIT sobre IRA induzida por CDDP, estudos anteriores conduzidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram a superioridade desta modalidade de treinamento na regulação do processo inflamatório e apoptótico quando comparado aos treinamentos contínuos de intensidades leve e moderada (Leite *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2023). Nesse sentido, o HIIT foi mais eficaz em preservar a estrutura e função renal, pelo menos em parte, devido à redução da ativação da via TLR4/NF- $\kappa$ B, com consequente redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da infiltração de células imunes no tecido renal de ratas com IRA induzida por CDDP (Leite *et al.*, 2021). O HIIT também foi superior em modular benéficamente marcadores da via intrínseca da apoptose, reduzindo a proteína pró-apoptótica Bax e aumentando a proteína antiapoptótica Bcl-2, e da via extrínseca da apoptose, reduzindo os receptores do TNF e a caspase 3 ativada (Oliveira *et al.*, 2023).

Por outro lado, alguns estudos apresentaram resultados que desencorajaram a prática de exercícios agudos de alta intensidade, devido ao aumento do estresse oxidativo e piora da proteinúria (Howden *et al.*, 2015). No entanto, é provável que os efeitos da prática regular e sistematizada de exercícios físicos de alta intensidade, como o HIIT, sejam diferentes daqueles proporcionados pelos exercícios contínuos intensos e agudos na prevenção das doenças renais. Portanto, diante da escassez de evidências científicas disponíveis, é notória a necessidade de mais investigações sobre o impacto de diferentes intensidades e modalidade de treinamento físico na prevenção e manejo de doenças renais. Assim, o presente estudo propõe-se a investigar os efeitos renoprotetores diferenciais entre o HIIT e outros dois protocolos de treinamentos físicos contínuos de intensidades leve e moderada sobre o *status redox* local de ratas com IRA induzida por CDDP.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo comparar os efeitos do treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) com os efeitos dos treinamentos contínuos de intensidade leve (LIT) e moderada (MIT) sobre a sinalização de Klotho/Nrf2 e o *status redox* nos rins de ratas com nefrotoxicidade induzida por cisplatina (CDDP).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar o impacto dos três protocolos de exercício físico sobre as alterações nos níveis de excreção de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio e magnésio) em ratas com IRA induzida por CDDP;
- 2- Avaliar o impacto dos três protocolos de exercício físico sobre as alterações histopatológicas do compartimento tubulointersticial nesses animais;
- 3- Avaliar o impacto dos três protocolos de exercício físico sobre marcadores de lesões nitro-oxidativas às macromoléculas celulares (lipídios, proteínas e DNA) nos rins dos animais;
- 4- Avaliar o impacto dos três protocolos de exercício físico sobre a expressão e/ou atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e HO-1) nos rins dos animais;
- 5- Analisar os efeitos dos três protocolos de exercício físico sobre a ativação da via de sinalização Klotho/Nrf2 no tecido renal desse modelo experimental.

### 4 METODOLOGIA

#### 4.1 ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Trinta e cinco ratas wistar com 10 semanas de idade e peso corporal inicial em torno de 190 a 220 gramas foram mantidas no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira - IMS/UFBA em ambiente com ciclo de claro/escuro (12 horas luz, das 7 às 19h) e controle de temperatura (23 +/- 2°C), com livre acesso a água e ração. As ratas foram divididas em cinco grupos experimentais: controle salino e sedentárias (C+S) (n=7); tratadas com cisplatina e sedentárias (CDDP+S) (n=7); tratadas cisplatina e submetidas ao treinamento

de intensidade leve (CDDP+LIT) (n=7); tratadas com cisplatina e submetidas ao treinamento de intensidade moderada (CDDP+MIT) (n=7) e tratadas com cisplatina e submetidas ao HIIT (CDDP+HIIT) (n=7). Os protocolos de treinamento duraram 8 semanas e foram efetuados em esteira motorizada. No final da 8ª semana, 48h após a última sessão de treinamento, as ratas receberam uma única injeção de CDDP (5 mg/kg; i.p.), ou uma injeção com volume pareado de solução salina. No 7º dia após as injeções foram colhidas amostras de sangue e urina de 24h, através de gaiolas metabólicas, e em seguida os animais foram eutanasiados. O rim direito foi retirado, desencapsulado, imediatamente criogenizado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C para análises da expressão gênica e ensaios colorimétricos, enquanto o rim esquerdo foi pesado, fixado e reservado para os estudos histopatológicos e de imunoistoquímica.

Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Experimentação Animal da Universidade Federal da Bahia - Instituto Multidisciplinar de Saúde (protocolo 056/2018), e todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as recomendações do National Institutes of Health Guide for the Cuidados e Uso de Animais de Laboratório.

#### 4.2 TESTE DE CORRIDA MÁXIMA

As ratas foram submetidas a um teste de corrida máxima com o intuito de determinar a intensidade do treinamento para cada animal, além de ajustar a intensidade do exercício no decorrer das semanas de treinamento, sendo realizado na 1ª, 5ª e 8ª semana do experimento. Inicialmente, as ratas permaneciam paradas na esteira, com inclinação de 10°, durante 5 minutos, e a velocidade foi aumentada em 1 m/min a cada 6 segundos até atingir a velocidade de 10m/min. A partir de então, o tempo foi disparado e a velocidade aumentada em 3 m/min a cada 2 minutos até que se atingisse a exaustão. Foi considerada exausta a rata que parava a corrida por 2 segundos por 3 vezes em um minuto, ou quando ela permanecia parada por 10 segundos. A média de três testes realizados em dias alternados era calculada para definição da capacidade física na 1ª, 5ª e 8ª semana do experimento.

#### 4.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

O treinamento foi realizado 5 dias/semana, durante 8 semanas, com a esteira em inclinação de 10°. Em todos os três protocolos de treinamento foram incluídos dentro do tempo total de treinamento, 5 minutos de aquecimento, no início de cada sessão, e 5 minutos de desaquecimento no final, ambos numa velocidade de 10 m/min (Leite et al., 2021).

O Treinamento Contínuo de Intensidade Leve (LIT) iniciou-se com uma velocidade de 45% da capacidade máxima por 31 minutos, aumentando progressivamente a velocidade até atingir 50% da capacidade máxima por 46 minutos. O Treinamento Contínuo de Intensidade Moderada (MIT) iniciou-se com uma velocidade de 55% da capacidade máxima por 37 minutos, aumentando progressivamente a velocidade até atingir 70% da capacidade máxima por 46 minutos. Finalmente, o Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT) consistiu em sessões de treinamento compostas por um determinado número de ciclos; cada ciclo era constituído por 2 min de corrida e 1 min de repouso passivo. Os animais iniciaram o protocolo com 7 ciclos, numa velocidade correspondente a 85% da capacidade máxima, com acréscimos semanais de 8% a velocidade, e aumento progressivo do número de ciclos até atingirem 12 ciclos no final do protocolo, totalizando assim um volume de treino de 46 minutos em cada sessão.

#### 4.4 DOSAGENS DE ELETRÓLITOS: SÓDIO, POTÁSSIO, CÁLCIO E MAGNÉSIO

Os níveis de sódio, potássio, cálcio e magnésio foram mensurados por potenciometria, utilizando-se um eletrodo íon seletivo (C.4100 Abbott Diagnostics - Saint-Laurent, Quebec, Canadá). Após as determinações das concentrações séricas e urinárias dos eletrólitos, foram calculadas as cargas e as frações de excreção (FE) de cada um desses íons de acordo com a fórmula abaixo:

$$FENa = \frac{\text{Concentração de Na}^+ \text{ urinário} \times \text{Concentração de creatinina plasmática}}{\text{Concentração de Na}^+ \text{ plasmático} \times \text{Concentração de creatinina plasmática}} \times 100$$

#### 4.5 ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS

Amostras de tecido renal foram fixadas por 24 horas em solução metacarn (proporção: metanol 60%, clorofórmio 30% e 10% de ácido acético) e processadas para inclusão em



parafina. Cortes histológicos de 4 µm foram desparafinizados, reidratados e corados com o reagente ácido periódico Schiff (PAS). Foram fotografados 15 campos microscópicos aleatórios de cada animal usando uma câmera digital (Kontron Electronic KS-300, Eching, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico com ampliação de 100X (BX51, Olympus, Japão). As proporções das áreas marcadas foram determinadas pelo limite de cor utilizando-se o software Image J (National Institutes of Health, EUA) e expressas como porcentagens.

#### 4.6 ESTUDOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Amostras de tecido renal foram fixadas por 24 horas em solução metacarn e processadas para inclusão em parafina. Cortes histológicos de 4 µm foram desparafinizados, reidratados e incubados durante a noite a 4°C com os anticorpos primários especificados: anti-nitrotirosina policlonal (1:200, MCA4761, Bio-Rad, USA), anti-HO-1 policlonal 1:100, E3F4S, Cell Signaling Technology, USA), anti-Klotho policlonal (1:200, PA5-88303, Invitrogen, EUA), anti-Nrf2 policlonal (1:400, PA5-88084, Invitrogen, EUA), anti-8-OHdG (1:400, bs1278R, Bioss Antibodies, EUA). Para detectar o produto da reação, utilizamos o complexo avidina- biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e revelado com 3,3- diaminobenzidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As seções foram então contrastadas com hematoxilina, desidratadas e montadas. Para avaliação das reações imuno- histoquímicas, fotografamos cerca de 10 a 15 campos microscópicos aleatórios por seção usando uma câmera digital (Kontron Electronic KS-300, Eching, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico com ampliação de 100X (BX51, Olympus, Japão). Em seguida, as proporções de áreas marcadas positivamente da medula renal externa de cada animal foram determinadas pelo limiar de cor utilizando o software Image J (National Institutes of Health, EUA) e expressas em porcentagens.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DO STATUS REDOX

O rim direito foi dividido em pedaços, criogenizado em nitrogênio líquido e estocado em freezer -80°C para realização de ensaios de avaliação do status redox.

#### 4.7.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

As concentrações de proteínas nos homogenatos de tecido renal utilizados para os ensaios de peroxidação lipídica e atividade enzimática foram determinadas em espectrofotometro (SP 2000 UV, BELR Photonics, Brasil) utilizando o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, EUA) e a soro-albumina bovina foi utilizada como padrão da curva.

#### 4.7.2 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O tecido renal foi homogeneizado em tampão Tris HCl (50 mM), centrifugado a 1600 xg por 10 minutos a 4°C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha) e o sobrenadante coletado para uso nas análises. A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric acid reactive substances - TBARS) no homogenato de tecido renal, utilizando o método descrito por Draper e colaboradores (1993) com adaptações. Resumidamente, 100 µL do homogenato foram misturados a 100 µL de ácido tricloroacético 10%, e 800 µL de ácido tiobarbitúrico (53 mg dissolvidos em 100 mL de ácido acético 20%). A mistura reacional foi incubada por uma hora a 95°C e em seguida, os tubos foram transferidos para um banho de gelo a fim de interromper a reação. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 1600 xg por 10 minutos a 4°C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha), e o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BELR Photonics, Brasil) no comprimento de onda de 535 nm. Os níveis de TBARS foram calculadas interpolando a absorbância das amostras à curva padrão feita com malondialdeído (0 - 50 µM), normalizados pela concentração de proteínas e expressos como µmol/mg de proteína.

#### 4.7.3 PROTEÍNAS CARBONILADAS

O nível de proteínas carboniladas nos homogenatos do tecido renal foi estimado pelo método descrito por Soglia et al. (2016) adaptado de Levine et al. (1990). As amostras foram homogeneizadas em solução gelada de KCl 0,15M (100mg/mL) e centrifugadas (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha) a 1.600xg por 10 min a 4 °C para coleta do sobrenadante. Posteriormente foram então tratadas com DNPH 0,3% em HCl 3M, ou apenas com HCl 3M para o branco da reação específica para cada amostra. Após 30 min de incubação, 400 uL de ácido tricloroacético a 40% foram adicionados para precipitação das proteínas, e as amostras foram centrifugadas a 5000xg por 5 min. Após a remoção do sobrenadante, o pellet foi lavado três vezes com 1 mL de etanol: acetato de etila (1:1), e cada lavagem foi seguida da centrifugação a 10.000xg por 5 min para isolamento e descarte do sobrenadante. Após a última lavagem, o pellet foi dissolvido em 1,5mL de cloridrato de guanidina 6M em NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 6,5. A absorbância das amostras foi lida nos comprimentos de onda de 280 nm e 370 nm em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil) para quantificação da concentração de proteínas e carbonilação, respectivamente. A concentração de proteínas carboniladas foi calculada pela fórmula descrita a seguir, e os resultados foram expressos como nmol/mg de proteína.

$$\text{Carbonilação} = \frac{|370| - |370| (\text{branco})}{22.000 \times [|280| - (|370| - |370| (\text{branco})) \times 0.43]} \times 10^6$$

#### 4.7.4 NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Os níveis de óxido nítrico (NO) no tecido renal foram estimados por método indireto através da dosagem dos nitritos totais usando o teste de Griess (Green et al. 1982). Alíquotas de 50 µL de sobrenadante de homogeneizado de tecido renal foram adicionadas a solução reagente de Griess a 0,1% (50 µL de N-[1-naftil]etilenodiamina 3,9 mM em 5% [v/v] de ácido fosfórico) e incubadas no escuro a temperatura ambiente durante 10 minutos numa placa de 96 poços. A solução de sulfanilamida (1% em ácido fosfórico) foi adicionada à mistura e, após 10 minutos de incubação, a absorbância foi medida a 540 nm utilizando um leitor de microplacas. Foram utilizadas soluções padrão de nitrato de sódio (0,1 mM) para construir uma curva padrão para determinar as concentrações da amostra.

#### 4.7.5 ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada segundo o método descrito por Aebi (1984), utilizando peróxido de hidrogênio como substrato. Foi mensurada a partir da taxa de decaimento de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na absorbância de 240 nm. O tecido renal foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,2) na proporção de 100 mg/mL, e em seguida será centrifugado por 10 minutos a 10000xg a 4 °C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha). O sobrenadante coletado (100 µL) foi incubado com 900 µL do mix reacional (25 mL de tampão fosfato para 40 µL de peróxido de hidrogênio 30%), e as absorbâncias foram imediatamente determinadas a cada 10 segundos, durante um minuto a 240 nm em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BELR Photonics, Brasil). O tampão fosfato foi utilizado como branco para zerar o aparelho. A atividade da CAT foi determinada pela diminuição da absorbância em 240 nm causada pelo desaparecimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e calculada pela fórmula descrita:

$$\textit{Atividade da catalase} = \frac{\Delta A_{240} / \textit{MIN}}{39,4 M^{-1} \textit{ cm}^{-1}} \times \frac{\textit{VR}}{\textit{VA}}$$

Onde: A<sub>240</sub> é o delta da absorbância por minuto;

39,4 é o coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em unidades de 39.4 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>;

VR é o volume de reação em mL;

VA é o volume de amostra em mL.

Uma unidade da enzima é equivalente a decomposição de 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína.

#### 4.7.6 ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)

Foi realizada de acordo com o método proposto por Paglia e Valentine (1967), com adaptações, que se baseia na oxidação da glutathiona reduzida (GSH), catalisada pela GPx, acoplada a reciclagem da glutathiona oxidada (GSSG) através da reação catalisada pela enzima glutathiona redutase (GR) que utiliza o NADPH como cofator. O decréscimo na absorbância

medida a 340 nm durante a oxidação do NADPH é indicativo da atividade da GPx. O tecido renal foi homogeneizado em tampão Tris HCL 50 mM, pH 7,0 (tampão de ensaio) na proporção de 100 mg/mL. Após centrifugação a 10000xg por 15 minutos a 4° C (Z 36 HK, Hermle- Labortechnik, Alemanha), o sobrenadante foi removido e utilizado no ensaio. Foram pipetados em cubeta de quartzo 300 µL de tampão de ensaio, 250 µL de homogenato diluído em tampão de ensaio (1:10) e 400 µL do mix reacional (0,25 mM NADPH, 2,1 mM de GSH, 0,5 U/mL de GR e 1 mM de azida sódica). A azida sódica foi adicionada ao meio para inibir a catalase que também utiliza o peróxido de hidrogênio como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2mM, utilizado como substrato da reação. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BELR Photonics, Brasil) a 340 nm. Foram realizadas leituras consecutivas a cada 15 segundos durante 6 minutos. A atividade da GPx foi calculada utilizando a fórmula descrita:

$$\text{Atividade da GPx} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{6,2 \mu\text{mol}/\text{min}} \times \frac{VR}{VA}$$

Onde:  $\Delta A_{340}$  é o delta da absorbância por minuto;

6,22 é o coeficiente de extinção molar do NADPH em unidades de  $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ;

VR é o volume de reação em mL;

VA é o volume de amostra em mL.

Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima que causa a oxidação de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto a 25° C. Os resultados foram expressos em unidade por miligramas de proteína.

#### 4.8 EXTRAÇÃO DE RNA E PCR EM TEMPO REAL

As expressões dos genes Nrf2, HO-1 e Klotho foram avaliadas no tecido renal congelado por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR). O RNA total do tecido renal congelado à -80°C foi extraído com o kit comercial RNeasy Mini (Qiagen, Germantown, MD) de acordo com as recomendações do fabricante, e as concentrações de RNA foram determinadas por NanoDrop (Thermo Scientific, EUA). O cDNA foi sintetizado usando

o kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os níveis de expressão do gene que codifica Nrf2 (Nfe2l2) foi realizado em duplicata, utilizando o TaqMan Gene Expression Assay (Rn00582415\_m1, Applied Biosystems, Foster City, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados qPCR foram desenvolvidos utilizando o sistema de detecção de sequência ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). A expressão dos genes que codificam as proteínas Klotho (F: CGTGAATGAGGCTCTGAAAGC; R: GAGCGTCACTAAGCGAATACG) e HO-1 (F: TCAGCACTAGTTCATCCCAG; R: AAGCTTTCTTAGAGGCCCAA) foram quantificadas utilizando o sistema PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystem, EUA) em duplicata, de acordo com as instruções do fabricante, sendo que o termociclador StepOne Plus (Applied Biosystem, EUA) foi utilizado para realização destes ensaios. O gene GAPDH (F: ATGCTGGTGCTGAGTATGTC; R: AGTTGTCATATTTCTCGTGG) foi utilizado como um controle interno. Para atestar 100% de identidade das sequências de primers, os anelamentos foram realizados com auxílio da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) da plataforma online National Center for Biotechnology Information (NCBI). A partir da obtenção dos resultados de Ct (cycle threshold) fornecidos pelo termociclador, foi calculado a expressão relativa (fold-change) por meio do método comparativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Livak; Schnittgen, 2001).

#### 4.9 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)

Níveis renais de 4-HNE (marcador de peroxidação lipídica) (MBS2615585 - kit ELISA 4-HNE [4-hidroxi-2-nonenal] de rato, MyBioSource), SOD1 (IT6753 - kit ELISA SOD1 de rato [superóxido dismutase Cu-Zn], G -Biosciences), catalase (AE59164RA – kit Rat Catalase [CAT] ELISA, ARP American Research Products, Inc.) e GPx (MBS744364 – kit Rat Glutathione Peroxidase [GPx] ELISA, MyBioSource) foram quantificados usando ensaio imunoenzimático (ELISA) (MyBioSource, San Diego, EUA). Alíquotas do sobrenadante do tecido renal foram homogeneizadas em 1,5 mL de PBS, pH 7,4, e posteriormente centrifugadas (10.000 g por 10 min). A quantificação foi realizada em duplicata de acordo com as instruções do fabricante. O método de Bradford foi utilizado para medir a concentração de proteína total e os resultados foram apresentados em pg/mg de proteína.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinar a normalidade da distribuição dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov e para a homogeneidade das variâncias o teste de Bartlett. Posteriormente, foi empregado o teste t de Student para comparar os grupos CDDP+S e C+S e a análise de variância e os testes de comparações múltiplas de Newman-Keuls foram empregados para comparações entre os grupos tratados com CDDP. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism 5 e a significância estatística foi determinada em  $p < 0,05$ .

## 5 REFERÊNCIAS

AEBI H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** v.105, p.121-6, 1984. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.

ANDRIANOVA, N.V. et al. Sex-Specific Effects of Estradiol and Progesterone in Ischemic Kidney Injury. **Int. J. Mol. Sci.** v. 25, 3155, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25063155>

ALMEIDA, A. A. *et al.* Nephroprotective effect of exercise training in cisplatin-induced renal damage in mice: influence of training protocol. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 55, 2022.

AMARAL, L. *et al.* Beneficial effects of previous exercise training on renal changes in streptozotocin-induced diabetic female rats. **Exp. Biol Med.** v. 241, n. 4, p. 437 - 45, 2016.

BORAN T. *et al* Celastrol pretreatment as a therapeutic option against cisplatin-induced nephrotoxicity. **Toxicol Res (Camb)**. v. 8, n. 5, p. 723-730, Jul, 2019.

CHEN W.Y. et al. Cisplatin Nephrotoxicity Might Have a Sex Difference. An analysis Based on Women's Sex Hormone Changes. **Journal of Cancer**. v.8, p. 3939–3944, 2017.

CHIRINO, Y. I.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Exp Toxicol Pathol.** v. 61, n. 3, p. 223–242, 2009.

CONTE, C *et al.* Role of Sex Hormones in Prevalente Kidney Diseases. **Int. J. Mol. Sci.** v. 24, p. 8244. 2023.

CRONA, DJ *et al.* A Systematic Review of Strategies to Prevent CisplatinInduce Nephrotoxicity. **The Oncologist**, 22, p. 609-619, 2017.

CUARENTAL L. *et al.* The transcription factor Fos11 preserves Klotho expression and protects from acute kidney injury. **Kidney Int.** v. 103, n. 4, p. 686- 701, Apr, 2023.

CUI, W., LENG, B.,WANG, G. Klotho protein inhibits H2O2-induced oxidative injury in



endothelial cells via regulation of PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 pathways. **Canadian journal of physiology and pharmacology**. V.97, n.5, p.370–376, 2019. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0277>

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1–2, p. 23–38, 2003.

DENG J.S. *et al.* *Cordyceps cicadae* Mycelia Ameliorate Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury by Suppressing the TLR4/NF- $\kappa$ B/MAPK and Activating the HO-1/Nrf2 and Sirt-1/AMPK Pathways in Mice. **Oxid Med Cell Longev**. v. 6, 2020.

DODSON, M.; CASTRO-PORTUGUEZ, R.; ZHANG, D. D. Nrf2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. **Redox Biology**. v. 23, 2019.

DOĞAN D.; MEYDAN İ.; KÖMÜROĞLU A.U. Protective Effect of Silymarin and Gallic Acid against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Hepatotoxicity. **Int J Clin Pract**. v. 2022, 2022.

DOS SANTOS J. D. M. *et al.* The 6-week Effects of HIIT on Biomarkers of Tissue and Oxidative Damage in Wistar Rats Previously Supplemented with Pyridoxine. **Int J Exerc Sci**. v. 14, n. 7, p. 369–381, 2021.

DRAPER HH. *et al.* Comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Med**. 1993 Oct;15(4):353–63. doi: 10.1016/0891-5849(93)90035-s.

DUAN, C, *et al.* Exercise-induced Klotho expression and its protective role in kidney injury. **International Urology and Nephrology**. v. 54, n. 2, p. 343–353, 2022

DUBEY RK, JACKSON EK. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. **Am J Physiol Renal Physiol**. v.280, n.3, p.365–88, 2001. doi: 10.1152/ajprenal.2001.280.3.F365. PMID: 11181399.

ESHRAHGI-JAZI F, et al. The protective role of endogenous nitric oxide donor (L-arginine) in cisplatin-induced nephrotoxicity: Gender related differences in rat model. **J Res Med Sci**. v.16 n.11, p. 1389–96, 2011.

ESHRAGHI-JAZI, F. et al. Sex differences in protective effect of recombinant human erythropoietin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Iranian journal of kidney diseases**. v.7, n.5, p. 383–389, 2013.

ESHRAGHI-JAZI, F.; NEMATBAKHSH, M. Sex difference in cisplatin-induced nephrotoxicity: Laboratory and clinical findings. **Journal of toxicology**. v. 2022, p. 3507721, 2022.

FAKHRPOUR R. *et al.* Effect of Sixteen Weeks Combined Training on FGF-23, Klotho, and Fetuin-A Levels in Patients on Maintenance Hemodialysis. **Iran J Kidney Dis**. v. 14, n. 4, p. 212-218, 2020.

FAN, X. *et al.* Daphnetin attenuated cisplatin-induced acute nephrotoxicity with enhancing antitumor activity of cisplatin by upregulating SIRT1/SIRT6-Nrf2 pathway. **Frontiers in Pharmacology**. v. 11, 2020.

FRANCESCATO, H. D. C. *et al.* Previous exercise effects in cisplatin-induced renal lesions in rats. **Kidney & blood pressure research**. v. 43, n. 2, p. 582–593, 2018.

FRANCESCATO, H. D.; COSTA, R. S.; JÚNIOR, F. B.; COIMBRA, T. M. Effect of JNK inhibition on cisplatin-induced renal damage. **Nephrolog dialysis transplantation**. v. 22, n.8, p. 2138–2148, 2007.

FRANCESCATO, H.D.C.; COSTA, R.S.; DA SILVA, C.G.; COIMBRA, T.M. Treatment with a p38 MAPK inhibitor attenuates cisplatin nephrotoxicity starting after the beginning of renal damage. **Life Sciences**. v.84, p. 590-597, 2009.

GARBER C.E. *et al.* Quantity and Quality of Exercise for Developing and Maintaining Cardiorespiratory, Musculoskeletal, and Neuromotor Fitness in Apparently Healthy Adults: Guidance for Prescribing Exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. V. 43, n.7, p. 1334-1359, 2011.

GEORGE, B *et al.* Time-dependent changes in kidney injury biomarkers in patients receiving multiple cycles of cisplatin chemotherapy. **Toxicology Reports**. p.571-576, 2020.

GHOSH S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorg Chem**. v. 88, 2019.

GOMEZ – PINILLA F; HILLMAN C. The Influence of Exercise on Cognitive Abilities. **Compr Physiol.** v.3, n 1, p. 403-428, 2013.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry.** v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GROUSSARD C, et al. Tissue-specific oxidative stress modulation by exercise: A comparison between MICT and HIIT in a obese rat model. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** v. 2019, p 1-11,2019.

GRZEGORCZYK, K. et al. Gender and kidney diseases: the clinical importance and mechanisms of modifying effects. **Advances in Hygiene and Experimental Medicine.** v.65, p. 849-857, 2011.

HOLDITCH, S. J. *et al.* Recent Advances in Models, Mechanisms, Biomarkers, and Interventions in Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. **Int J Mol Sci.** v. 12, p. 3011, 2019.

HOWDEN, E *et al.* The role of physical training in the treatment of chronic kidney disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension.** v. 24, n. 6, p. 480-487, 2015.

HU M. C.; MOE O.W. Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury. **Nat Rev Nephrol.** v. 8, n. 7, p. 423-9, 2012.

JELINEK, MJ *et al.* Predicting Acute Renal Injury in Cancer Patients Receiving Cisplatin Using Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin na Cystatin C. **Clin Transl Sci,** v. 11, p. 420-427, 2018.

JILANCHI S. *et al.* Vitamin E is a nephroprotectant agent in male but not in female in a model of cisplatin-induced nephrotoxicity. **ISRN Nephrol,** v. 2013, 2013.

KANG, J. S., *et al.* Protective effects of klotho on palmitate-induced podocyte injury in diabetic nephropathy. **PLoS One,** v.16, n.4, e0250666, 2021.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250666>

KARASAWA T.; STEYGER P.S. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. **Toxicol Lett.** v. 237, n.3, p. 219-27, 2015.

KDIGO. Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl.* v. 2, n. 1, p. 1-138, 2012.

KIM D. H. *et al.* Farnesoid X receptor protects against cisplatin-induced acute kidney injury by regulating the transcription of ferroptosis-related genes. **Redox Biol.** v. 54, p. 102382, 2022.

KING, G. D., ROSENE, D. L., ABRAHAM, C. R. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. **Age (Dordrecht, Netherlands).** V.34, n.6, p. 1405–1419, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9315-4>

KIRKMAN D.L. *et al.* Effect of aerobic exercise on vascular function in nodialysis chronic kidney disease: a randomized controlled trial. **Am J Physiol Renal Physiol.** v.316, n.5, p. 898- 905, 2019.

KO, JW. *et al.* Melatonin attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in rats via induction of anti-aging protein, Klotho. **Food Chem Toxicol.** v. 129, p. 201-210, 2019.

LAJER, H. *et al.* Magnesium depletion enhances cisplatin-induced nephrotoxicity. In: **Cancer Chemother Pharmacol.** v.56, p.535-542, 2005.

LAVIE CJ, ARENA R, Swift DL, JOHANNSEN NM, SUI X, LEE DC, EARNEST CP, CHURCH TS, O'KEEFE JH, MILANI RV, BLAIR SN. Exercise and the cardiovascular system: clinical science and cardiovascular outcomes. **Circ Res.** v.117, n.2, p.207-19, 2015. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.305205. PMID: 26139859; PMCID: PMC4493772.

LEITE, A. B. *et al.* High-intensity interval training is more effective than continuous training to reduce inflammation markers in female rats with cisplatin nephrotoxicity. **Life sciences.** v. 266, n. 118880, p. 118880, 2021.

LEVINE RL. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.

**Methods Enzymol.** 186:464-78, 1990. doi: 10.1016/0076-6879(90)86141-h.

LIU, J. *et al.* The characteristics and risk factors for cisplatin-induced acute kidney injury in the elderly. **Therapeutics and Clinical Risk Management.** v.14, p. 1279-1285, 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method. Methods.** v. 25, p. 402-408, 2001

LU, K. *et al.* Ding, Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. **Mol. Med. Rep.** v. 12, p. 2374–2382, 2015.

MACHADO, M.V. Aerobic Exercise in the Management of Metabolic Dysfunction Associated Fatty Liver Disease. **Dovepress.** v.14, p. 3627–3645, 2021.

MACINNIS M.J.; GIBALA M.J. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. **J Physiol.** v. 595, n. 9, p. 2915-2930, 2017.

MALHEIROS, LFL *et al.* Renoprotective mechanisms of exercise training against acute and chronic renal diseases – A perspective based on experimental studies. **Life Sciences.** v. 346, n. 122628, 2024.

MANOHAR, S.; LEUNG, N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. **Journal of Nephrology.** v. 31, p. 15-25, 2018.

MATSUMURA, Y. *et al.* Identification of the human Klotho gene and its two transcriptions encoding membrane and secreted Klotho protein. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 242, n. 3, p. 626-630, 1998.

MC DANIEL, B. L e BENTLEY, M. L. The role of medications and their management in acute kidney injury. **Integr Pharm Res Pract.** V. 18, n. 4, p. 21-29, 2015.

MCSWEENEY K.R. *et al.* Apostolopoulos V. Mechanisms of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury: Pathological Mechanisms, Pharmacological Interventions, and Genetic Mitigations. **Cancers (Basel).** v. 13, n.7, p. 1572, 2021.

MERCADO M. G.; SMITH D. K.; GUARD E. L. Acute Kidney Injury: Diagnosis and Management. **Am Fam Physician.** v.100, n, 11, p. 687-694, 2019.

MENG, H. *et al.* Ameliorative effect of daidzein on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice via modulation of inflammation, oxidative stress, and cell death. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** 3140680, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3140680>

MIYAGI, M. Y. S. *et al.* Long-term aerobic exercise protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by modulating the expression of IL-6 and HO-1. **PloS one.** v. 9, n. 10, p. 108543, 2014

MORENO, J. A. *et al.* The inflammatory cytokines TWEAK and TNF $\alpha$  reduce renal klotho expression through NF $\kappa$ B. **Journal of the American Society of Nephrology.** V.22, n.7, p. 1315–1325, 2011. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010101073>

MORISHIMA T.; OCHI E. Impact of a single bout of resistance exercise on serum Klotho in healthy young men. **Physiol Rep.** v. 9, n. 21, 2021.

MITOBE, M., *et al.* Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. **Nephron. Experimental nephrology.** v.101, n.2, p.e67–e74, 2005. <https://doi.org/10.1159/000086500>

NEMATBAKHS M. *et al.* Cisplatin-Induced Nephrotoxicity; Protective Supplements and Gender Differences. **Asian Pac J Cancer Prev.** v. 18, n. 2, p. 295- 314, 2017.

NEMATBAKHSI M. *et al.* Vitamin E, vitamin C, or losartan is not nephroprotectant against cisplatin-induced nephrotoxicity in presence of estrogen in ovariectomized rat model. **Int J Nephrol.** v. 2012, 2012.

NEMATBAKHSI M.; PEZESHKI Z. Sex-related difference in nitric oxide metabolites levels after nephroprotectant supplementation administration against cisplatin-induced nephrotoxicity in wistar rat model: The role of Vitamin E, erythropoietin, or N-Acetylcysteine. **ISRN Nephrol.** v. 2013, 2013.

NEMATBAKHSI, M. *et al.* Gender difference in Cisplatin-induced nephrotoxicity in a rat model: greater intensity of damage in male than female. **Nephro-urology monthly.** v. 5, n. 3, p. 818–821, 2013.

NEVES, R. V. P. *et al.* Renoprotection Induced by Aerobic Training Is Dependent on Nitric Oxide Bioavailability in Obese Zucker Rats. **Oxid Med Cell Longev.** v. 28, 2021

NING Y, *et al.* Necrostatin-1 Attenuates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity Through Suppression of Apoptosis and Oxidative Stress and Retains Klotho Expression. **Front Pharmacol.** v. 19, n. 9, p. 384, 2018.

NOROOZI, J. *et al.* Nonpreventive role of aerobic exercise against cisplatin-induced nephrotoxicity in female rats. **International journal of preventive medicine.** v. 6, n. 1, p. 58, 2015.

OH, G.S. *et al.* Cisplatin-induced kidney dysfunction and perspectives on improving treatment strategies. **Electrolytes Blood Press E BP.** v.12, n. 2, p.55–65, 2014.

OLIVEIRA, C.A. *et al.* Benefits of high-intensity interval training compared to continuous training to reduce apoptotic markers in female rats with cisplatin nephrotoxicity – possible modulatory role of IL-11. **Apoptosis.** v. 28, p. 566–575, 2023.

OLIVEIRA, C. A. et al. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity, hepatotoxicity, and cardiotoxicity: Characteristics, common molecular mechanisms, and current clinical management. **Clinical and Experimental Nephrology**. v.1, p.1-17, 2024. <http://dx.doi.org/10.1007/s10157-024-02490-x>

OZKOK, A.; CHARLES L.; EDELSTEIN. Pathophysiology of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. **BioMed Research International**. p. 967826, 2014.

PAGLIA DE., VALENTINE WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab Clin Med**. v.70, n.1, p.158-69, 1967.

PANESSO MC. *et al.* Klotho has dual protective effects on cisplatin-induced acute kidney injury. **Kidney Int**. v. 85, n. 4, p. 855-870, 2014.

PERES LAB, DA CUNHA AD. Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms. **J Bras Nefrol**. v.35 n.4 p.332–40, 2013.

PERSE, M.; VECERIC-HALER Z. Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. **Biomed Res Int**. 2018.

PEZESHKI, Z. *et al.* Estrogen abolishes protective effect of erythropoietin against cisplatin-induced nephrotoxicity in ovariectomized rats. **ISRN oncology**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

PEZESHKI, Z. *et al.* Evidence Against Protective Role of Sex Hormone Estrogen in Cisplatin- Induced Nephrotoxicity in Ovariectomized Rat Model. **Toxicology International** v. 20, n. 1, p. 43-47, 2013.

PHELPS M, *et al.* Decline in muscle strength and running endurance in klotho deficient C57BL/6 mice. **Biogerontology**, v. 14, p. 729-739, 2013.



PINCKARD K, BASKIN KK, STANFORD KI. Effects of Exercise to Improve Cardiovascular Health. **Front Cardiovasc Med.** v.4, n.6, p. 69, 2019. doi: 10.3389/fcvm.2019.00069. PMID: 31214598; PMCID: PMC6557987.

QIAN, Y. *et al.* Klotho Reduces Necroptosis by Targeting Oxidative Stress Involved in Renal Ischemic-Reperfusion Injury. Cellular physiology and biochemistry. **International journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.** v. 45, n. 6, p. 2268–2282, 2018.

Quintanilha JCF, de Sousa VM, Visacri MB, Amaral LS, Santos RMM, Zambrano T, et al. Involvement of cytochrome P450 in cisplatin treatment: implications for toxicity. **Cancer ChemotherPharmacol.** v.80, n. 2, p. 223–33, 2017.

RAMEZ M. *et al.* The greater effect of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through Klotho levels and attenuate of myocardial TRPC6 expression. **BMC Cardiovasc Disord.** v. 19, n. 1, p. 118, 2019.

ROMERO, A. *et al.* (2019). The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis protects from endothelial cell senescence via klotho and Nrf2 activation. *Aging cell*, 18(3): e12913. <https://doi.org/10.1111/accel.12913>

ROSS, LM *et al.* High-intensity interval training (HIIT) for patients with chronic diseases. **Journal of Sport and Health Science.** v. 5, p. 139–144, 2016.

SAGHIV M. S.; SIRA D. B.; GOLDHAMMER E.; SAGIV M. The effects of aerobic and anaerobic exercises on circulating soluble-Klotho and IGF-I in young and elderly adults and in CAD patients. **J Circ Biomark.** v. 6, n. 1, 2017.

SHIMIZU, M. H. *et al.* N-acetylcysteine attenuates renal alterations induced by senescence in the rat. **Experimental gerontology.** v. 48, n. 2, p. 298–303, 2013.

SILBINGER SR, NEUGARTEN J. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. **Am J Kidney Dis.** v.25, n.4, p.515-33, 1995. doi: 10.1016/0272-6386(95)90119-1. PMID: 7702046.

STRAUB RH. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocr Rev.** v.28, n.5, p.521-74, 2007. doi: 10.1210/er.2007-0001. Epub 2007 Jul 19. PMID: 17640948.

SOGLIA, F., PETRACCI M., ERTBJERG P. Novel DNPH-based method for determination of protein carbonylation in muscle and meat. **Food Chem.** v.15;197(Pt A):670-5, 2016. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.038.

STAKISAITIS D. *et al.* Cisplatin increases urinary sodium excretion in rats: gender-related differences. **Medicina (Kaunas).** v. 46, n. 1, p. 45-50, 2010.

SUN L *et al.* Protective effect of the BET protein inhibitor JQ1 in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Am J Physiol Renal Physiol.** 315(3): p 469–478, 2018.

SZABÓ C.; ISCHIROPOULOS H., RADI R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nat Rev Drug Discov.** v. 6, n. 8, p. 662-680, 2007.

SAGHIV, M. S., SIRA, D. B., GOLDHAMMER, E., SAGIV, M. The effects of aerobic and anaerobic exercises on circulating soluble-Klotho and IGF-I in young and elderly adults and in CAD patients. **Journal of circulating biomarkers.** v.6, 1849454417733388, 2017. <https://doi.org/10.1177/1849454417733388>.

SHEN, Y *et al.* Effects of high-intensity interval versus mild- intensity endurance training on metabolic phenotype and corticosterone response in rats fed a high-fat or control diet. **PLoS One.** v. 12, n. 7, 2017.

TANASE, DM *et al.* The predictive role of the biomarker kidney molecule-1 (KIM-1) in acute kidney injury (AKI) cisplatin- induced nephrotoxicity. **Int. J. Mol. Sci.** 20, p. 2-20, 2019.

TUAN BT *et al.* Effects of High-Dose Cisplatin Chemotherapy and Conventional Radiotherapy on Urinary Oxidative and Nitrosative Stress Biomarkers in Patients with Head and Neck Cancer. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 118, p 83–86, 2016.

TUCKER PS, SCANLAN AT, DALBO VJ. Chronic Kidney Disease Influences Multiple Systems: Describing the Relationship between Oxidative Stress, Inflammation, Kidney Damage, and Concomitant Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2015.

TUCKER PS, SCANLAN AT, DALBO VJ. High Intensity Interval Training Favourably Affects Angiotensinogen mRNA Expression and Markers of Cardiorenal Health in a Rat Model of Early-Stage Chronic Kidney Disease. **Biomed Res Int**. May, 2015.

TUCKER P, *et al.* Genomic Integrity Is Favourably Affected by High-Intensity Interval Training in an Animal Model of Early-Stage Chronic Kidney Disease. **Sports Med Open**. v. 9, n. 2, 2016.

VOLAREVIC, V *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. **Journal of Biomedical Science**. 26(25), p. 1-14, 2019.

WANG L. *et al.* High-Intensity Interval Training and Moderate-Intensity Continuous Training Attenuate Oxidative Damage and Promote Myokine Response in the Skeletal Muscle of ApoE KO Mice on High-Fat Diet. **Antioxidants (Basel)**. v. 10, n. 7, p. 992, Jun, 2021.

WANG S. *et al.* Paricalcitol Ameliorates Acute Kidney Injury in Mice by Suppressing Oxidative Stress and Inflammation via Nrf2/HO-1 Signaling. **Int J Mol Sci**. v. 24, n. 2, p. 969, Jan, 2023.

XING, L. *et al.* Klotho ameliorates diabetic nephropathy by activating Nrf2 signaling pathway in podocytes. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 534, p. 450–456, 2021.

XU Z. *et al.* Effects of Moderate-Intensity Continuous Training and High-Intensity Interval Training on Testicular Oxidative Stress, Apoptosis and m6A Methylation in Obese Male Mice. **Antioxidants (Basel)**. v. 11, n. 10, p. 1874, Sep, 2022.

YOON S. Y.; KIM J. S.; JEONG K.H.; KIM S.K. Acute Kidney Injury: Biomarker-Guided Diagnosis and Management. **Medicina (Kaunas)**. v. 58, n. 3, p. 340, Feb, 2022.

ZEYNALI, F. *et al.* Protective Role of Aerobic Exercise Against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. **Asian Journal of Sports Medicine**. v. 6, n. 3, 2015.

ZHOU, Z. *et al.* Aerobic exercise training alleviates renal injury in db/db mice through inhibiting Nox4-mediated NLRP3 inflammasome activation. **Experimental gerontology**. v. 168, p. 111934, 2022.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluindo, nosso estudo avançou na elucidação dos efeitos renoprotetores de três diferentes protocolos de treinamento físico na IRA induzida por CDDP em um modelo experimental. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o treinamento físico modulou benéficamente o estado redox, aumentando as defesas antioxidantes e reduzindo importantes marcadores de lesão nitroxidativa às macromoléculas celulares no tecido renal. É possível sugerir que tais benefícios podem ter sido, pelo menos parcialmente, relacionados às adaptações fisiológicas envolvendo a via de sinalização Klotho/Nrf2 no tecido renal de maneira dependente da intensidade. Portanto, nossos resultados apoiam a hipótese de que o HIIT é mais eficaz na redução da nefrotoxicidade induzida por CDDP devido ao aumento da capacidade de defesa antioxidante neste modelo experimental e pode abrir caminho para pesquisas futuras a fim de investigar o impacto de diferentes protocolos de treinamento em pacientes que se submeterão à quimioterapia anti câncer.