

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA TRANSLACIONAL

EFEITOS DO TRATAMENTO COM KEFIR SOBRE A NEFROPATIA
INDUZIDA POR ISQUEMIA REPERFUSÃO EM RATOS

Jamila Rodrigues Barboza

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Mestrado em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória - ES, Setembro de 2016

JAMILA RODRIGUES BARBOZA

EFEITOS DO TRATAMENTO COM KEFIR SOBRE A NEFROPATIA
INDUZIDA POR ISQUEMIA REPERFUSÃO EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ágata Lages Gava

Co-Orientador: Prof. Eduardo Frizzera Meira, MSc.

Vitória-ES

2016

JAMILA RODRIGUES BARBOZA

EFEITOS DO TRATAMENTO COM KEFIR SOBRE A NEFROPATIA
INDUZIDA POR ISQUEMIA REPERFUSÃO EM RATOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ágata Lages Gava
Orientadora

Prof. Eduardo Frizzera Meira, MSc.
Co-Orientador

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Examinador Externo

Prof. Dr. Leonardo dos Santos
Examinador Interno

Vitória - ES, Setembro de 2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado a cada amanhecer e me dado paz, sabedoria, discernimento e saúde. Pela força para superar cada tribulação, e dom de agradecer por cada momento.

À Sagrada Família por sua intercessão, principalmente à minha mãezinha Maria.

Aos meus pais, Jamil e Luzia, pelo exemplo de determinação e garra. A vocês devo toda minha fidelidade, carinho e atenção. Tudo o que tenho é graças a vocês. Obrigada pelo incentivo e ajuda na conquista dos meus objetivos. Vocês são meu tesouro maior! Amo muito vocês!!

Aos meus maninhos, Jamiliane e Thales, que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado, mesmo estando longe. Sem vocês minha vida não seria completa. Obrigada pelos momentos de alegria e pelo apoio. Amo vocês!

Ao Lucas, pelo companheirismo e incentivo, e por me ajudar em todos os momentos. Obrigada por estar ao meu lado em todas as minhas decisões. Você é tudo o que pedi a Deus. Te amo!!

Ao Thorus, meu companheiro fiel. Que mesmo sem nunca entender nada sempre esteve ao meu lado.

À minha amiga Lívia que sempre me escutou e entendeu meus momentos de ausência, tristeza e angústia. Você foi fundamental para eu viver bem em Vitória! Te amo amiga!

Ao meu sogro e minha sogra, pelo apoio e carinho de sempre.

À professora Ágata, minha orientadora, por ter me dado oportunidade de trabalhar com ela e hoje ser sua aluna. Agradeço principalmente pela

sua paciência, compreensão e carinho, pelos ensinamentos e competência na orientação, por sua força de vontade e dedicação admirável o que a tornou referência para mim. Obrigada também por todos os carinhosos puxões de orelha. Eu lhe admiro muito professora!

Aos professores Vasquez e Silvana, por me acolherem no laboratório. Obrigada pela paciência, pela compreensão, pelo apoio, pelos ensinamentos e ideias. Agradeço pelos exemplos que são para mim. Admiro muito vocês!!

À galera da renal Flávia, Laís, Stephanie, Sthephany, Camilla e Eduardo, vocês me ensinaram tudo o que sei. Obrigada pela ajuda, pelo apoio, paciência, companheirismo, por me tirarem as inúmeras dúvidas. Agradeço por ouvirem minhas angustias e desabafos, e pelos bate-papos e momentos de descontração.

Aos meus amigos do LFT Brunella, Thais, Fran, João Victor, Vinícius, Victor, Rossana e Brenna. Obrigada pelos momentos de apoio e descontração, por nossos *happy hour*, churrascos, momentos de treinos físicos, por me ouvirem e me aturarem.

Ao pessoal do laboratório LFT, Marcella, Ysabella, Allan, Thiago, Ananda e Marcos, e a todas as outras pessoas que passaram pelo laboratório durante o desenvolvimento deste projeto, que me ajudaram, ouviram e aconselharam diante de dúvidas. Obrigada pela ajuda de vocês.

Ao Prof.^o Dr.^o Leonardo dos Santos e Prof.^o Dr.^o Breno Valentim, e ao Prof. Eduardo Frizzera Meira, Msc, que contribuíram com seus conhecimentos e me nortearam na conclusão da minha dissertação.

Aos demais professores e amigos do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, obrigada pelos conhecimentos, pelas ajudas, apoio e

ideias.

Aos demais amigos e familiares por sempre terem entendido minha ausência e de alguma forma terem me ajudado.

Há Momentos

*“Há momentos na vida em que sentimos tanto
a falta de alguém que o que mais queremos
é tirar esta pessoa de nossos sonhos e abraçá-la.
Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance de fazer aquilo que se quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes
não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passam por suas vidas.*

*O futuro mais brilhante
é baseado num passado intensamente vivido.
Você só terá sucesso na vida
quando perdoar os erros e as decepções do passado.*

*A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar
duram uma eternidade.
A vida não é de se brincar porque um belo dia se morre.”*

Clarice Lispector

Aos meus ratinhos, sem eles essa dissertação jamais poderia ser escrita.

"O que o bem-estar animal precisa é de pessoas educadas com cabeças frias e corações quentes, preparadas para ver o sofrimento dos animais e procurando meios práticos de aliviá-los". Charles Hume, 1926

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxa de filtração glomerular avaliada pelo <i>clearance</i> de inulina.....	37
Figura 2 - Fluxo plasmático renal avaliado pelo <i>clearance</i> de PAH	38
Figura 3 – Avaliação do fluxo sanguíneo renal.....	39
Figura 4 – Avaliação da resistência vascular renal.	40
Figura 5 - Produção de ânion superóxido. Histogramas representativos por citometria de fluxo usando DHE e quantificação da produção de óxido nítrico no córtex (A) e medula (B) renal.....	42
Figura 6 - Produção de óxido nítrico. Histogramas representativos por citometria de fluxo usando DAF e quantificação da produção de óxido nítrico no córtex (A) e medula (B) renal.....	44
Figura 7 - Detecção de apoptose por citometria de fluxo com Anexina-V e IP. Dot plot representativo da citometria de fluxo de células renais marcadas com Anexina-V e PI e gráfico de barras mostrando a média de porcentagem de células apoptóticas (Q2+Q4) para córtex (A) e medula (B) renal.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modelos animais de LRA para experimentos laboratoriais.....	20
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina trifosfato
CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
I/R - Isquemia/reperfusão
LRA - Insuficiência renal aguda
NaCl - Cloreto de sódio
TFG - Taxa de filtração glomerular
FPR - Fluxo plasmático renal
kDa - Quilodalton
PE - Polietileno
MM – Massa molecular
I.P. – Intraperitoneal
PAH – Para-aminohipurato
C - *Clearance* da substância (inulina ou PAH)
X_u - Concentração da substância X na urina
X_p - Concentração da substância X no plasma
V - Fluxo urinário
P - Massa corpórea do animal
FSR - Fluxo sanguíneo renal
RVR - Resistência vascular renal
PAM - Pressão arterial média
PBS - Tampão Fosfato Salino
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
SFB - Soro fetal bovino
DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
DHE - Dihidroetídeo
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
PI - Iodeto de propídeo
EPM - Erro padrão da média
ANOVA - Análise de Variância
LRA – Lesão renal aguda
K - kefir
FG – Filtração Glomerular
DR – Doença Renal
IRC – Insuficiência renal crônica
RIFLE - *Risk, Injury, Failure, Loss and End-stage*
AKIN - *Acute Kidney Injury Networks*
SCr – Creatinina Sérica
UFC/g – Unidade formadora de colônias por grama
FAO/WHO - *Food and Agriculture Organization/ World Health Organization*
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
M – Peso molecular
NO – Óxido nítrico
DAF - 4,5-diaminofluoresceína

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Lesão renal aguda.....	16
1.1.1. Fisiopatologia da lesão renal aguda.....	17
1.1.2. Modelos Experimentais de LRA	20
1.2. Kefir.....	21
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivos gerais.....	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Kefir.....	27
3.1.1. Administração do kefir.....	28
3.1.2. Grupos experimentais	28
3.2. Indução da lesão renal aguda	29
3.3. Função renal	30
3.4. Isolamento das células do córtex e da medula renal.....	33
3.5. Análise das células por citometria de fluxo.....	33
3.6. Quantificação de ânions superóxido e óxido nítrico	34
3.6.1. Viabilidade e apoptose celular.....	34
3.7. Análise estatística	35
4. RESULTADOS	37
4.1. Avaliação da função renal	37
4.1.1. Taxa de filtração glomerular.....	37
4.1.2. Fluxo plasmático renal.....	38
4.1.3. Fluxo sanguíneo renal.....	38
4.1.4. Resistência vascular renal.....	39
4.2. Avaliação do estresse oxidativo	40
4.2.1. Ânion superóxido.....	40
4.2.2. Óxido Nítrico.....	42
4.3. Apoptose	44
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é uma doença multifatorial, que acomete milhares de pessoas no mundo. Entretanto, ainda não existe nenhuma terapia usada especificamente para o tratamento de doenças renais isquêmicas, necessitando assim de novas abordagens. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do kefir de leite de vaca, um leite probiótico fermentado, sobre a função renal, o estresse oxidativo e a apoptose celular em animais com lesão renal aguda. A indução da LRA foi realizada em ratos Wistar machos por meio do modelo de isquemia reperfusão, que consiste na isquemia renal bilateral por 45 minutos, seguida por 24 horas de reperfusão. Os animais foram distribuídos em cinco grupos: Sham; Sham kefir; isquemia/reperfusão (I/R) e I/R kefir com administração por 14 e 60 dias em grupos distintos, antes da indução da LRA. O kefir foi administrado por gavagem, a uma dose de 0,3 mL/100g de peso corporal. Para os grupos que não receberam o kefir, foi administrado 0,3 mL/100g de peso corporal de leite de vaca tipo C por dia, com pH ajustado para 4,3. Após este período, foi realizada a avaliação da função renal através do *clearance* de inulina e para-aminohipurato (PAH), para obtenção da taxa de filtração glomerular, fluxo plasmático renal e sanguíneo renal e resistência vascular renal. Ao final dos experimentos, o córtex e medula renal foram removidos para a quantificação do estresse oxidativo e apoptose por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstram que, conforme esperado, o grupo I/R apresentou uma diminuição do *clearance* de inulina, PAH e do fluxo sanguíneo renal quando comparados aos animais Sham, bem como aumento da resistência vascular renal. A LRA também resultou em aumento na produção das espécies reativas de oxigênio e apoptose. Os dados da citometria de fluxo demonstram aumento significativo na produção de ânions superóxido e diminuição da produção de óxido nítrico nos animais com LRA, quando comparados ao grupo Sham, estas alterações foram melhoradas pelo tratamento com kefir. A apoptose também mostrou-se aumentada no grupo I/R, e o tratamento com kefir reduziu significativamente o nível de apoptose. Estes resultados sugerem que o kefir pode prevenir a LR induzida por isquemia reperfusão, provavelmente por meio da redução do stress oxidativo e apoptose, indicando que a utilização do kefir como um adjuvante não farmacológico possui potencial terapêutico para retardar a progressão das complicações renais.

Palavras-chave: isquemia reperfusão; lesão renal aguda; kefir.

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is a multifactorial disease that affects thousands of people around the world. However, no specific therapy is available to treat acute ischemic kidney diseases, and new approaches are needed. This investigation aimed to evaluate the effects of kefir, a probiotic fermented milk, on renal function, oxidative stress and apoptosis in animals AKI. The induction of AKI was achieved in male Wistar rats through 45 minutes of renal ischemia and 24 hours of reperfusion. The animals were divided into five groups: control (Sham); Control kefir; ischemia/reperfusion (I/R) and I/R kefir (I/R/K). The kefir was administered daily by gavage at a dose of 0.3 mL/day per 100g body weight for 14 or 60 days before IR. In the groups did not received kefir were administered 0.3 mL/100g body weight of cow's milk per day Type C, pH adjusted to 4.3. After renal function was determined using inulin and para-aminohippurate (PAH) *clearance*, to quantify glomerular filtration rate, renal plasma flow, renal blood flow and renal vascular resistance. Renal cortex and medulla were removed to oxidative stress and evaluation of apoptosis by flow cytometry. Our results demonstrate that IR rats showed a decrease in the inulin and PAH *clearances*, and renal blood flow and an increase in renal vascular resistance when compared to Sham animals. Flow cytometry data showed significant increase in the production of superoxide anions and decreased nitric oxide production in animals with AKI when compared to the Sham group; these changes were ameliorated by treatment with kefir. It was also observed an increased apoptosis in the I/R group, and kefir significantly reduced the level of apoptosis. These results suggest that treatment with kefir can prevent renal injury induced by ischemia reperfusion, probably by reducing oxidative stress and apoptosis, indicating that kefir may be used as non-pharmacological adjuvant to slow the progression of renal complications.

Keywords: ischemia reperfusion; acute kidney injury; kefir.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão renal aguda

Sabe-se que os rins desempenham um papel de extrema importância na homeostasia corporal. Dentre as funções desempenhadas pelos rins, podemos citar a filtração do sangue, excreção de catabólitos, regulação do equilíbrio hidro-eletrolítico, regulação equilíbrio ácido-base, regulação da volemia, osmolaridade do líquido extracelular, regulação da pressão arterial, síntese de hormônios e gliconeogênese (EATON, POOLER, et al., 2006).

Uma diminuição progressiva da função renal leva ao comprometimento de todos os outros órgãos. A função renal pode ser avaliada utilizando-se diversos parâmetros, entretanto, o mais importante corresponde a filtração glomerular (FG), e sua diminuição é observada na doença renal (DR) associada à perda das funções regulatórias, excretórias e endócrinas do rim (BASTOS, BREGMAN, KIRSZTAJN, 2010).

Neste sentido, a doença renal é diagnosticada quando há alteração da função dos rins mantida por um período variável, podendo ser caracterizada como insuficiência renal aguda (IRA) ou insuficiência renal crônica (IRC). A IRC é definida pela presença de lesão renal ou redução da função renal durante três ou mais meses, enquanto que a IRA é definida como a diminuição da função renal em horas ou dias (OLIVEIRA, ALVES, BEZERRA, 2009).

O grupo Acute Kidney Injury Network recentemente criou o termo lesão renal aguda (LRA) para substituir o termo IRA. Isso ocorreu, pois o termo “lesão” engloba todos os diagnósticos relacionados à IRA, visto que um declínio rápido da função renal normalmente é secundário a uma lesão renal que já provocou alguma alteração na estrutura ou função dos rins (MEHTA et al., 2007).

Atualmente são diagnosticados com LRA os pacientes com aumento da creatinina sérica superior igual a 0,3 mg/dL em um período de 48 horas, ou aumento da creatinina sérica 1,5 vezes maior igual que o valor basal em menos de 7 dias, ou

volume urinário menor que 0,5 mL/kg/h em 6 horas (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012).

A mortalidade destes pacientes varia entre 20 e 87%, a depender da causa, forma clínica e severidade. Daqueles que sobrevivem aproximadamente metade consegue recuperar a função dos seus rins completamente, e a outra metade progride para a IRC. A mortalidade está associada a vários fatores como idade maior que 60 anos de vida, a forma da apresentação da oligúria e anúria, a presença de complicações, como pulmonar e cardiovascular, e infecção.

1.1.1. Fisiopatologia da lesão renal aguda

Uma das principais causas da LRA inclui a lesão renal por isquemia reperfusão. A isquemia é definida como a interrupção de fluxo sanguíneo e conseqüentemente, oxigênio e nutrientes para o tecido, e a reperfusão é o restabelecimento do fluxo sanguíneo (MOLITORIS; SUTTON, 2004). A fisiopatologia da isquemia reperfusão envolve vários eventos hemodinâmicos, celulares e moleculares, que culminam na vasoconstrição intrarenal, depleção de ATP, acúmulo de Ca intracelular, geração das espécies reativas de oxigênio (ROS), entre outros, promovendo a diminuição da filtração glomerular (GUELER et al., 2004; LEONARD et al., 2002).

Durante a isquemia, a degradação da adenosina trifosfato (ATP) em adenosina, inosina, hipoxantina e xantina, leva a disfunção da Na-K-ATPase, que culmina em sobrecarga de cálcio intracelular e converte a xantina desidrogenase em xantina oxidase. Na reperfusão a conversão da hipoxantina em xantina, catalisada pela enzima xantina oxidase, irá sintetizar ROS, incluindo os ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila. Os danos causados pelas ROS para as células tubulares renais ocorrem pela oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, danos no DNA e pela indução de apoptose (BUSSMANN et al., 2014).

Conhecida como "morte celular programada", a apoptose é um tipo de autodestruição que ocorre na célula de forma ordenada, sem afetar as células vizinhas (ALBERTS, 2002). Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas que incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz

extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007). É um processo de grande importância para a vida celular por estar envolvida na rotatividade das células normais, no desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico, no desenvolvimento embrionário e na morte celular induzida por químicos. Entretanto, a ocorrência de apoptose de forma desordenada e inadequada é um fator presente em diversas doenças, incluindo doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes, câncer e na lesão por isquemia reperfusão renal (ELMORE, 2007).

A ocorrência de apoptose na LRA pode ser iniciada pela redução dos níveis de oxigênio teciduais e consequente aumento na produção de ROS. Quando a célula passa pelo período de hipóxia, ocorre alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma (DESAGHER; MARTINOU, 2000; GUPTA, 2003).

O aumento da produção de ROS é uma via importante no início da apoptose, pois ativa a via intrínseca da apoptose. Nesta via, o aumento do stress oxidativo resulta em alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, seguida da liberação do citocromo *c* e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (GUPTA, 2003). No citosol o citocromo *c* forma o complexo apoptossomo com a proteína humana fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF-1) e a pro-caspase 9. Após a clivagem da pro-caspase-9, a enzima caspase-9 é liberada na sua forma ativa que irá ativar a caspase-3, levando a ativação de endonucleases, degradação do DNA cromossomal e condensação da cromatina. Adicionalmente também ocorre a ativação de proteases, que degradam as proteínas nucleares e do citoesqueleto, que se reorganizam levando a condensação do citoplasma (ELMORE, 2007). As proteínas pro-apoptóticas liberadas incluem o complexo Smac/DIABLO e HtrA2/Omi, as quais inibem proteínas inibidoras da apoptose, e o fator Indutor de Apoptose (AIF) migra da mitocôndria para o núcleo, induzindo a condensação da cromatina independentemente da ativação das caspases (BRÖKER, KRUYT, GIACCONE, 2005).

Um outro fator importante no desenvolvimento e progressão da LRA é a inflamação, que também é desencadeada pela baixa oferta de oxigênio. Esta promove disfunção endotelial com aumento da produção de endotelina, um potente peptídeo com

propriedades vasoativas (RAMESH; REEVES, 2004; SCHMIEDT et al., 2012). A vasoconstrição induzida pelo aumento de endotelina dificulta ainda mais o aporte de oxigênio para o tecido agravando a isquemia (COSTA et al., 2003).

Ocorre também o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , TGF-P, etc.) e citocinas quimiotáticas (proteína quimiotática de monócitos-1 [MCP-1], IL-8, RANTES- regulado por células T normais expresso ativado), dentre outros (RAMESH e REEVES, 2004; DEVARAJAN, 2006). Essas citocinas ativam leucócitos, que se aderem as células endoteliais, através de moléculas de P-seletina e ICAM-1, que migrarão pelo interstício provocando aumento da permeabilidade microvascular, potencializando as interações com leucócitos e plaquetas (BONVENTRE e ZUK, 2004; ROELOFS, et al. 2006; FUGII et al., 2003; LAMEIRE e VANHOLDER, 2004). Os leucócitos ativados promovem a liberação de ROS, citocinas e vasoconstritores que levarão ao aumento local da reação inflamatória, e contribuirão de forma indireta para a permanência da isquemia devido a hipoperfusão na medula renal (BONVENTRE e ZUK, 2004).

Conforme acima descrito, diversos são os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da LRA, o que dificulta o seu tratamento. As intervenções já consagradas, tais como uso de diuréticos ou dopamina demonstram resultados clínicos pouco consistentes. As “promessas” terapêuticas que indicaram alta eficácia em modelos experimentais, como peptídeos natriuréticos e fatores de crescimento, não obtiveram resultados encorajadores nos estudos realizados. Certamente, esta falta de eficácia e objetividade terapêutica está ligada ao fato de que, mesmo após décadas de pesquisa, os mecanismos exatos deflagrados pela lesão tubular que são responsáveis pela queda de filtração glomerular permanecem desconhecidos. No momento, os tratamentos mais eficazes são, otimização das condições clínicas do paciente, evitar novos agravamentos renais e a instituição de terapêutica de apoio, evitando hipo ou hipervolemia, queda do débito cardíaco, alterações eletrolíticas e acidose, sangramento gastrointestinal, desnutrição, anemia e o surgimento de focos infecciosos. Assim sendo, novas abordagens terapêuticas são necessárias. (BURDMANN et al., 1998)

1.1.2. Modelos Experimentais de LRA

Experimentalmente, a LRA pode ser induzida por diversos métodos. Uma recente revisão publicada por Singh e colaboradores descreveu os principais modelos experimentais para indução da LRA, os quais encontram-se resumidos na tabela abaixo.

Tabela 1 – Modelos animais de LRA para experimentos laboratoriais (adaptado de SINGH et al., 2012)

Modelo Animal	Dose e via de administração
Glicerol	Dose única de 8-10 ml/kg, <i>im</i> Dose única de 8 mg/kg, <i>im</i> (mais comum)
Gentamicina	Intervalo de dose de 40-200 mg/kg durante 4-10 dias Dose de 100 mg/kg, <i>ip</i> durante 5 dias (mais comum)
Cisplatina	Intervalo de doses de 5-40 mg/kg, <i>ip</i> em dose única Dose de 100 mg/kg (mais comum)
Ácido Fólico	Dose única de 250 mg/kg, <i>iv</i>
Sepse	Ligadura e perfuração cecal três vezes A administração de lipopolossacarídeos (LPS) 2,5-15 mg/kg Dose única de LPS 15 mg / kg, <i>ip</i> (mais comum)

im: intramuscular; *iv*: intravenosa; *ip*: intraperitoneal.

Nesta mesma revisão, Singh e colaboradores (2012) ao analisarem os mais diversos modelos de indução da LRA, concluíram que o modelo animal que melhor representa as alterações hemodinâmicas da função renal em humanos é a isquemia renal realizada por 45 minutos seguida por 24 horas de reperfusão. Heyman, Rosemberger e Rosen (2010), afirmaram que a aplicabilidade e a viabilidade desse modelo são resultante da similaridade da resposta inflamatória, congestão medular e lesão tubular obtidos por biopsia renal em pacientes com LRA.

1.2. Kefir

Nos últimos anos a dieta voltada para a saúde humana tem sido foco de muita discussão. Diversos estudos têm indicado que o aumento da ingestão de frutas, verduras e legumes está associado com a diminuição do número de indivíduos que possuem doenças crônicas por meio da melhora no equilíbrio antioxidante e pro-oxidante do organismo humano (NAUTIYAL et al., 2008_a).

Acompanhado da necessidade de melhorar a qualidade de vida da população, uma vasta gama de produtos com diferentes funcionalidades foram lançados no mercado. Dentre estes, os produtos com microrganismos vivos na sua composição parecem estar associados a diferentes efeitos benéficos (ROMANIN et al., 2010), mesmo não sendo totalmente entendidos os mecanismos pelos quais exercem suas ações (BOIRIVANT e STROBER, 2007).

Um importante grupo de alimentos funcionais com a presença de microrganismos em sua composição são os chamados probióticos. Probióticos são alimentos ou suplementos alimentares que contêm bactérias e/ou leveduras vivas que são benéficas para a saúde de seu hospedeiro. Esses também são utilizados pela indústria alimentícia na produção de queijos e produtos lácteos fermentados (LEITE et al., 2013; ZUBILLAGA et al., 2001).

A FAO/WHO (2002) define probióticos como “microrganismos viáveis, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro”, que o leva a ser considerado um “alimento funcional”. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) em sua Portaria nº 398, de 30/04/99 alimento funcional é “todo aquele alimento ou ingrediente que, além das suas funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde humana”.

Um exemplo de probiótico comumente estudado é o kefir, um composto natural com propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias (HUSSEINI et al., 2012). Originário das montanhas do Cáucaso, na Rússia, a palavra kefir é derivada da palavra turca “Keyif”, que significa “sentir-se bem”, possuindo como características sensoriais

sabor típico de levedura, com efeito efervescente sentido na boca por ser uma bebida viscosa e ácida (LEITE et al., 2013).

O kefir de leite de vaca é obtido pela fermentação do leite quando inoculado por grãos gelatinosos e porosos, branco-amarelados e pelo kefiran. Este por sua vez, é formado por uma colônia de polissacarídeos com microrganismos em simbiose. Algumas das bactérias encontradas são o *Saccharomyces kefir* e *Torula kefir*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus delbrueckii*, subsp. *Bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, subsp. *Lactis*, *Leuconostoc* spp e o *Hennenbergs kefir bacillus* (FERREIRA et al., 2005). Além desses, são encontradas bactérias do ácido láctico (Lactobacilos, Lactococos, Leuconostoc) e bactérias de ácido acético (WANG et al., 2016). As principais leveduras capazes de fermentar a lactose encontrada em grãos de kefir são *Kluyveromyces marxianus/Candida kefir*, *Kluyveromyces lactis var Lactis*, *Debaryomyces hansenii* e *Dekkera anomala*, enquanto os fermentadores não-lactose incluem *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *fermentans*, *Tais Pichia*, *unispora Kazachstania*, *Saccharomyces turicensis*, *Issatchenkia orientalis* e *Debaryomyces occidentalis* (LEITE et al., 2013).

O consumo do kefir tem sido associado a várias propriedades promotoras de saúde, tais como antimicrobiana, antitumoral, efeitos imunomoduladores e hipocolesterolêmicos, além de ser usado no tratamento de diferentes distúrbios gastrintestinais (WANG et al., 2016).

Devido aos vários efeitos benéficos comprovados pela ingestão do kefir e pelo grande número de microrganismos (10^7 ufc/g), o kefir é uma provável fonte de pesquisas dos probióticos. Assim, pesquisas envolvendo o uso kefir têm aumentado na última década tanto para conhecimento de microrganismos envolvidos nos potenciais benefícios, como para desenvolvimento de tecnologias que garantam a persistência da funcionalidade durante a produção e armazenamento da bebida (GUZEL-SEYDIM, KOK-TAS, GRENE, 2011).

Estudos em diversas áreas do conhecimento têm demonstrado um potencial terapêutico para a utilização do kefir. Klippel et al. (2016), verificaram que o kefir atenuou a hipertensão arterial e a hipertrofia cardíaca, além de melhorar o tônus autonômico cardíaco em ratos espontaneamente hipertensos. Em estudo conduzido por Hussein et al (2012) foi avaliada a cicatrização de lesões em ratos que

receberam géis de kefir como tratamento e foi concluído que aqueles que tiveram suas feridas tratadas com o gel de kefir experimentaram cicatrização mais rápida do que as feridas nos animais controle.

Um dos mecanismos pelos quais o kefir parece exercer efeitos benéficos em diferentes doenças inclui a redução do stress oxidativo. Em estudo realizado por AMER et al. (2013) observaram que o kefir apresentou atividade antioxidante maior que a vitamina C na proteção contra os danos oxidativos. Estudos realizados por Friques et al. (2015) demonstraram o kefir como atenuante da disfunção endotelial em grandes vasos de condutância em ratos espontaneamente hipertensos através da diminuição de espécies reativas de oxigênio, e reestabelecimento da biodisponibilidade de óxido nítrico.

O kefir também parece possuir potencial anti-inflamatório. Estudos demonstram o efeito redutor da inflamação em ratos com asma induzida por ovoalbumina. O tratamento com kefir diminuiu de forma significativa o número de células inflamatórias e a contagem de eosinófilos no fluido broncoalveolar (HONG et al., 2011). De acordo com estes dados, Yasuysa e colaboradores (2015) observaram que o uso de probióticos suprime a inflamação em modelos de ratos com Alzheimer. Ehlers et al. (2011) realizaram estudo com produto de leite fermentado contendo esteróis Ile-Pro-Pro e Val-Pro-Pro e vegetais em ratos espontaneamente hipertensos e observaram que as vias de sinalização relacionadas com respostas inflamatórias encontravam-se diminuídas para a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e aumentadas para expressão de genes de citocinas anti-inflamatórias.

Apesar dos diferentes estudos sobre os efeitos do kefir em diversas situações, seus efeitos sobre a função renal são pouco estudados. Devido as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, nossa hipótese é que o uso do kefir possa exercer um efeito protetor contra o desenvolvimento e/ou progressão da LRA.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos benéficos do kefir sobre a lesão renal aguda experimental em ratos Wistar.

2.2. Objetivos específicos

Em ratos submetidos à isquemia/reperfusão e seus respectivos controles, avaliar os efeitos do kefir sobre:

- Parâmetros de função renal como a taxa de filtração glomerular, o fluxo plasmático e sanguíneo renal, a resistência vascular renal;
- Produção renal de espécies reativas de oxigênio como ânions superóxido e óxido nítrico;
- Apoptose de células renais.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, pertencentes à linhagem Wistar, machos, com peso entre 225g e 300g, provenientes do biotério da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob condições controladas e estáveis de temperatura (22°C), umidade (50-70%) e em ciclo claro-escuro (12/12horas), onde receberam água e ração *ad libitum*. Estes animais foram alojados na Sala de Experimentação Animal situada no prédio do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

A criação e o manuseio dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e sociedades experimentais de biologia e fisiologia.

Os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, tendo sido aprovado na reunião ordinária de 03 de outubro de 2014, certificando o protocolo nº 043/2014 para o referente projeto.

3.1. Kefir

Os grãos para o preparo do kefir utilizados no presente estudo foram gentilmente cedidos pela MSc. Iêda Carneiro Kallil, professora da Universidade de Vila Velha – Espírito Santo.

O kefir foi produzido por meio do seu método artesanal. Para tanto, foi feita a adição direta dos grãos de kefir no leite de vaca tipo C (4%). Seguiu-se um período de fermentação a temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, os grãos de kefir foram separados do leite fermentado com o auxílio de uma peneira e lavados com água filtrada. O kefir (leite fermentado) foi armazenado e estocado sob refrigeração a 4°C por 24 horas para maturação como sugerido por Otles e Cadingi (2003). Para armazenamento e conservação, o kefir foi acondicionado em tubos

falcon de 50 mL e estocado a -20°C até sua utilização.

3.1.1. Administração do kefir

Os animais receberam veículo (0,3 mL/100g de peso corporal de leite de vaca Tipo C por dia, com pH ajustado para 4,3) ou o kefir de leite de vaca (0,3 mL/100g de peso corporal de leite fermentado por dia), por meio da técnica da gavagem. A administração do kefir foi realizada em dois grupos distintos: pelo período de 14 dias em um grupo, e em outro pelo período de 60 dias, ambos antes da indução da LRA ou da cirurgia Sham. Esses períodos foram definidos baseados nos trabalhos de Klippel et al. (2016) e Friques et al. (2015) realizados no laboratório de Fisiologia Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

3.1.2. Grupos experimentais

Para este estudo os animais foram divididos em cinco grupos experimentais:

I) Sham + veículo

Neste grupo os animais receberam o veículo por 14 dias e depois foram submetidos ao procedimento cirúrgico fictício Sham da isquemia reperfusão renal (I/R);

II) Sham + kefir

Neste grupo os animais receberam kefir por 14 dias e depois foram submetidos ao procedimento cirúrgico fictício Sham da isquemia reperfusão renal;

III) I/R + veículo

Neste grupo os animais receberam veículo por 14 dias e depois foram submetidos ao procedimento cirúrgico da isquemia reperfusão renal;

IV) I/R + kefir 14 dias

Neste grupo os animais receberam kefir por 14 dias e depois foram submetidos ao procedimento cirúrgico da isquemia reperfusão renal;

V) I/R + kefir 60 dias

Neste grupo os animais receberam kefir por 60 dias e depois foram submetidos ao procedimento cirúrgico da isquemia reperfusão renal.

3.2. Indução da lesão renal aguda

Para a indução da LRA, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (91/9,1 mg/Kg de peso corporal) por via intraperitoneal e posicionados em decúbito dorsal. Posterior à tricotomia, foi realizada uma incisão abdominal e exteriorização do intestino para a exposição dos pedículos renais direito e esquerdo. As artérias renais foram separadas das veias, sob visão direta, e amarradas com linha cirúrgica (Endocort, nº0, Laboratórios Bruneau S.A.), a fim de impedir o suprimento sanguíneo aos rins. Após 45 minutos de isquemia a linha foi removida e o fluxo sanguíneo para os rins reestabelecido (WU et al., 2014). Isso é possível perceber ao ser realizado o clampeamento, o rim se torna visivelmente menos avermelhado adquirindo uma cor escura, assim, quando a linha é removida da artéria renal o órgão volta a sua coloração de origem. Foram suturados a camada muscular e a incisão cutânea central do abdômen (catgut simples 4.0, Shalon e Endocort, nº0, Laboratórios Bruneau S.A.), e logo após realizada a assepsia com álcool 70%. Os animais pertencentes ao grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico citado, exceto pela ligadura nas artérias renais.

Durante todo o tempo cirúrgico os animais tiveram sua temperatura controlada pelo uso de uma manta cirúrgica, a fim de manter a temperatura corporal do animal em torno de 37°C. Após a cirurgia, foi administrada uma injeção subcutânea de solução salina (1mL de NaCl 0,9%) para prevenir a desidratação do animal. Findado todos os procedimentos os animais foram mantidos em observação até passar o efeito anestésico (BETZ et al., 2012).

3.3. Função renal

Após vinte e quatro horas do procedimento da isquemia reperfusão foi realizada a avaliação da função renal por meio do *clearance* de inulina e *clearance* de para-aminohipurato, que correspondem respectivamente a taxa de filtração glomerular (TFG) e ao fluxo plasmático renal (FPR).

A inulina é um polissacarídeo com peso molecular de 5kD livremente filtrada, não é reabsorvida e nem secretada. Assim sua depuração é um método padrão para determinação da taxa de filtração glomerular. O ácido para-amino-hipúrico é uma substância orgânica com peso molecular de 194Da solúvel em água. Esse ânion é uma substância livremente filtrada e totalmente secretada, representando assim o fluxo plasmático renal (EATON, POOLER, 2006).

Os animais foram anestesiados com Tiopental Sódico (50mg/Kg i.p) para realização da traqueostomia (tubo de polietileno - PE-90) a fim de facilitar a respiração do animal. Foram cateterizadas ainda a artéria femoral (PE 20) e a veia femoral (PE20) para a realização da coleta de sangue e aquisição dos parâmetros hemodinâmicos, e a infusão das soluções de manitol, inulina e para-aminohipurato (PAH), respectivamente. A bexiga foi exteriorizada e canulada (PE 240) para a coleta das amostras de urina durante o experimento.

Após a realização da canulação, a cânula de polietileno inserida na artéria foi conectada a um sistema de aquisição de dados (MP100, Biopac Systems, USA) por meio de um transdutor de pressão (Cobe Laboratories, USA). A cânula introduzida na veia foi conectada a uma seringa de vidro com capacidade de 20mL (BD, Yale, Brasil) por meio de um tubo de polietileno (PE 50 – nacional), com velocidade de infusão de 0,06mL/minuto controlada por uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, USA).

Durante o período de estabilização foi injetada uma solução de manitol 3% em salina 0,9% por 30 minutos. Devido ao seu baixo peso molecular (M=182), o manitol é filtrado pelos glomérulos, e por não ser reabsorvido ele continua a ser osmoticamente ativo nos túbulos o que explica sua ação como um diurético osmótico (SHAWKAT; WESTWOOD; MORTIMER, 2012).

Foi realizada posteriormente, uma injeção *in bolus* de 1mL de solução *prime* por via

intravenosa, sendo esta composta de solução salina 0,9%, manitol 3%, inulina (300 mg/Kg - *Inulin from dahlia tubers*, Santa Cruz) e PAH (6,66 mg/Kg - *Sigma-Aldrich*), a fim de aumentar de forma rápida a concentração dessas últimas substâncias na corrente sanguínea. Em seguida, com o intuito de manter constante a concentração das substâncias, foi injetado via bomba infusora a solução de infusão composta por salina 0,9%, manitol 3%, inulina (15mg/Kg - *Inulin from dahlia tubers*, Santa Cruz) e PAH (4mg/Kg - *Sigma-Aldrich*), a uma velocidade constante de 0,06mL/minuto.

Após a infusão da solução *prime*, foram feitas a cada trinta minutos quatro coletas de urina e de sangue. O sangue foi centrifugado e o plasma retirado para quantificação de inulina e PAH, bem como nas amostras de urina. Também foi realizada a coleta de sangue através da utilização de um tubo capilar heparizado, que foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm (Centrimicro Mod 211, Fanem - SP) para a quantificação do hematócrito.

Utilizando-se os métodos colorimétricos para determinação de inulina (FUHR, KACZMARCZYK, KRUTTGEN, 1955) e PAH (SMITH et al., 1945) foram determinadas as concentrações plasmáticas e urinárias destas substâncias. A TFG e o FPR foram calculados a partir do *clearance* dessas substâncias, de acordo com a (1):

$$C = \frac{\left(\frac{[X_u] \times [V]}{X_p} \right)}{P} \quad (1)$$

Onde:

- C = *clearance* da substância (inulina ou PAH) normalizado pelo peso corpóreo do animal;
- X_u = concentração da substância na urina;
- X_p = concentração da substância no plasma;
- V = fluxo urinário;
- P = massa corporal do animal (kg).

A quantificação do hematócrito possibilitou o cálculo do fluxo sanguíneo renal, conforme indicado pela (2):

$$\text{FSR} = \frac{\text{FPR}}{(1 - \text{hematócrito})} \quad (2)$$

Onde:

- FSR = fluxo sanguíneo renal;
- FPR = fluxo plasmático renal.

A pressão arterial média dos animais foi registrada durante todo o protocolo da função renal. Essa pressão foi utilizada para calcular a resistência vascular renal de acordo com a Equação (3):

$$\text{RVR} = \frac{\text{PAM}}{\text{FSR}} \quad (3)$$

Onde:

- RVR = resistência vascular renal;
- PAM = pressão arterial média;
- FSR = fluxo sanguíneo renal.

3.4. Isolamento das células do córtex e da medula renal

Após a realização do protocolo da função renal foi realizado o isolamento das células do rim direito, tanto do córtex quanto da medula. Para tanto, o animal foi perfundido com 150 mL de solução de *Krebs-Hepes* com glicose (pH 7,4) através do ventrículo esquerdo. O rim direito foi coletado, e o córtex e a medula foram separados sob visão direta, em Placa de Petri sobre gelo seco, e posteriormente armazenados em microtubo (capacidade 1mL) contendo 1 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS). Os tecidos foram mantidos em PBS até o momento do isolamento.

Para o isolamento, o tecido foi retirado do PBS, colocado em microtubo vazio e triturado com auxílio de tesoura cirúrgica. O material picotado foi incubado na Tripsina (25%) em EDTA por 30 minutos à 37°C para desagregação das células. Em seguida o material foi filtrado em *cell strainer* (BD falcon 70 µm) para a obtenção apenas de células no filtrado, removendo os demais resíduos.

Após uma sequência de centrifugações e lavagens das células com solução PBS para a remoção das enzimas, as células foram armazenadas por até 24 horas à -20°C e depois à -80°C em solução de soro fetal bovino (SFB) contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), até que fossem analisadas no citômetro de fluxo (FACSCanto II Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA, EUA).

3.5. Análise das células por citometria de fluxo

Após o descongelamento das amostras das células isoladas, uma alíquota foi retirada para realização da citometria de fluxo, utilizando o aparelho FACSCanto II Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA, EUA, acoplado a um computador. Os dados adquiridos foram analisados pelos softwares BDFASCSDiva e FCSExpress (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA) com intensidade de fluorescência proporcional a quantidade de marcação no tecido.

3.6. Quantificação de ânions superóxido e óxido nítrico

Os níveis citoplasmáticos do ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) intracelular foram determinados nas células isoladas do córtex e da medula renal direita, através da intensidade de fluorescência emitida pelo marcador dihidroetídeo (DHE). O corante foi clivado no interior da célula, e na presença das EROS esse composto se oxida emitindo fluorescência de cor vermelha (DHE), cuja intensidade foi proporcional à concentração intracelular do ânion. A fluorescência vermelha ocorreu pela presença da oxidação do DHE ao etídeo quando em contato com os ânions superóxido (CARTER, NARAYANAN, ROBINSON, 1994; TONINI et al., 2013). Para detectar as fluorescências do DHE foi utilizado o filtro de 585/42 com excitação das células a 488 nm.

Para a detecção da biodisponibilidade do NO (óxido nítrico) foi adicionado às células o diacetato de 4,5-diaminofluoresceína a 37°C por 180 minutos, protocolo realizado no escuro. As amostras para o controle positivo foram incubadas com 10 μM de nitroprussiato de sódio. A intensidade de fluorescência verde emitida foi proporcional a quantidade de NO produzido. Para a quantificação da fluorescência emitida pelo DAF, as células foram excitadas a 488 nm e os sinais foram obtidos usando filtro de 530/30.

A análise dos dados foi expressa como média geométrica, pela determinação da intensidade média de fluorescência de 10.000 eventos. Os dados foram analisados usando o software BDFASCSDiva (Becton Dickinson) e a sobreposição dos histogramas pelo FCSExpress (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

3.6.1. Viabilidade e apoptose celular

A viabilidade celular e apoptose foram determinadas utilizando a marcação com o reagente Annexin V-FitC Apoptosis Detection Kit® (DB Pharmingen, San Diego, CA, USA) composto da proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) e do corante iodeto de propídeo (PI), seguida de análise no citômetro de fluxo.

Para início do experimento, as células renais foram lavadas duas vezes com PBS,

em seguida adicionados 2 μ L de anexina V-FITC e 2 μ l de PI e vortexados. Após incubação de 15 minutos à 25°C no escuro, as células foram analisadas no citômetro de fluxo (FACSCanto II Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA, EUA).

Assim, os resultados obtidos neste ensaio ocorreram pela ligação entre a proteína anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina. A localização desses resíduos permitiu identificar qual o estágio em que as células isoladas do córtex e da medula renal se encontravam.

Em uma célula viável, esses resíduos encontram-se na parte interna da célula. Quando o resíduo sinalizado pela anexina V foi encontrado na parte externa da membrana, nos mostrou que a célula estava no processo de apoptose celular, ou morte celular programada. O PI é o marcador padrão de viabilidade, sendo usado para distinguir quais células se encontram viáveis. Assim, aquelas células viáveis com membranas intactas, não eram coradas. Porém, a associação do PI com a anexina V permitiu identificar quais células estavam em estágio final e inicial de apoptose.

As células que foram marcadas com Anexina V-/PI+ foram reconhecidas como necróticas, as marcadas com Anexina V+/PI+ foram reconhecidas em estado de apoptose tardia, as marcadas com Anexina V+/PI- foram reconhecidas em estado de apoptose inicial, e as células com V-/PI- foram reconhecidas como células viáveis (MONGA et al., 2013).

3.7. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando-se análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo *Post-hoc* de Tukey utilizando o Prisma (Prism 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da função renal

4.1.1. Taxa de filtração glomerular

Os resultados do *clearance* de inulina, correspondentes à taxa de filtração glomerular, estão representados na figura 1. O tratamento com kefir não alterou o *clearance* de inulina no grupo Sham kefir ($5,2 \pm 0,3$ mL/min/Kg), quando comparado ao grupo Sham veículo ($6,2 \pm 0,2$ mL/min/Kg). Como esperado, a I/R resultou em diminuição da TFG ($3,0 \pm 0,2$ mL/min/Kg). A administração de kefir por 14 dias, anteriormente à indução da I/R, não melhorou significativamente este parâmetro ($2,9 \pm 0,2$ mL/min/Kg), porém a administração do kefir por 60 dias resultou em melhora significativa ($4,7 \pm 0,7$ mL/min/Kg) da TFG.

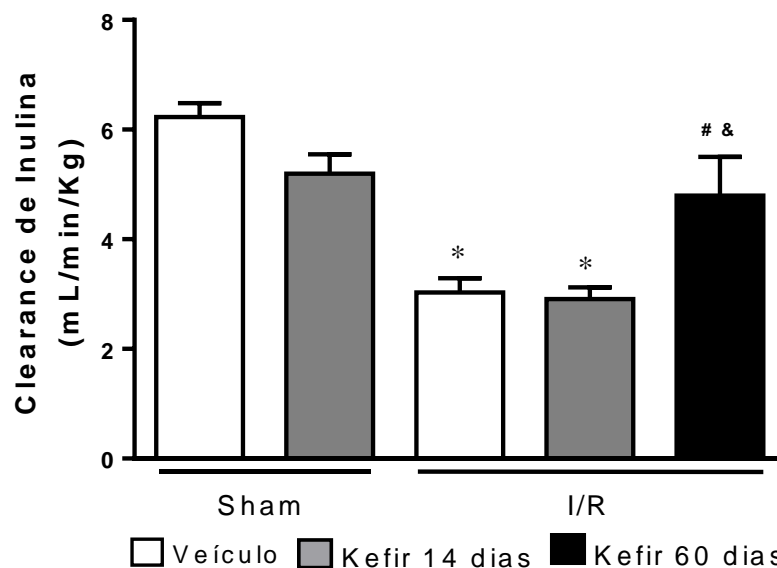


Figura 1 - Taxa de filtração glomerular avaliada pelo *clearance* de inulina nos grupos Sham VC (n=6), Sham kefir (n=6), I/R VC (n=6), I/R kefir 14 dias (n=6), I/R kefir 60 dias (n=7). *p<0.05 vs Sham, #p<0.05 vs I/R Veículo e &p<0.05 vs I/R kefir 14 dias.

4.1.2. Fluxo plasmático renal

Os resultados do *clearance* de PAH representam o FPR, e estão demonstrados na Figura 2. O *clearance* de PAH não foi afetado pela administração do kefir no grupo Sham (VC: $17,9 \pm 1,9$ vs. kefir: $14,8 \pm 2,5$ mL/min/Kg). No entanto, como já era esperado, a indução da I/R reduziu o FPR nos animais que receberam veículo ($7,8 \pm 1,6$ mL/min/Kg). A administração do kefir por 14 dias ($11,1 \pm 1,6$ mL/min/Kg) e por 60 dias ($10,2 \pm 1,2$ mL/min/Kg, $p < 0,05$) não resultou em melhora do FPR.

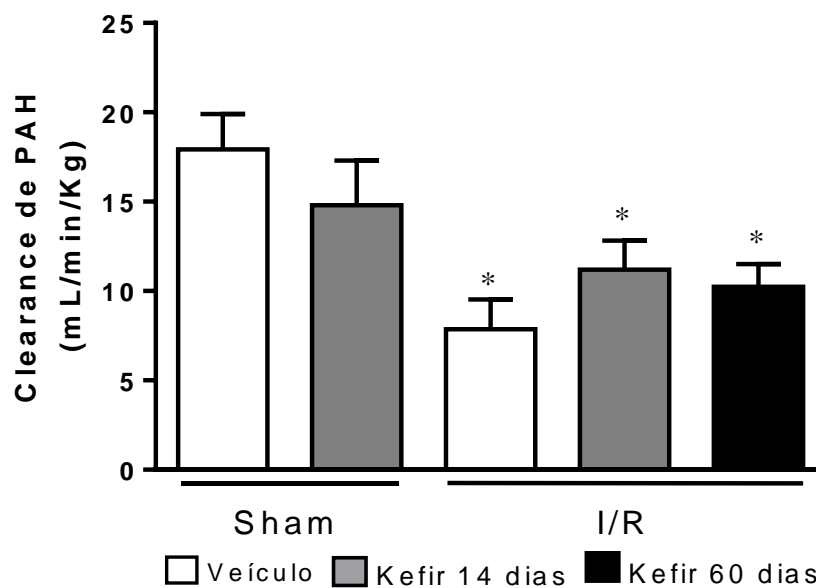


Figura 2 - Fluxo plasmático renal avaliado pelo *clearance* de PAH nos grupos Sham VC (n=6), Sham kefir (n=6), I/R VC (n=6), I/R kefir 14 dias (n=6), I/R kefir 60 dias (n=7). * $p < 0,05$ vs Sham.

4.1.3. Fluxo sanguíneo renal

Os resultados a seguir representam o fluxo sanguíneo renal, que foi calculado utilizando os valores de hematócrito medidos durante a execução do protocolo de função renal, e os valores do *clearance* de PAH. O FSR não foi alterado pela administração do kefir no grupo Sham (Sham VC: $29,9 \pm 3,3$; Sham kefir: $25,1 \pm 4,5$ mL/min/Kg). Porém, a indução da I/R reduziu o FSR do grupo que recebeu veículo ($12,7 \pm 2,8$ mL/min/Kg). O tratamento com kefir por 14 dias ($18,9 \pm 3,0$ mL/min/Kg) e

por 60 dias ($17,6 \pm 3,3$ mL/min/Kg) não resultou em melhora do FSR. Estes resultados encontram-se demonstrados na figura abaixo.

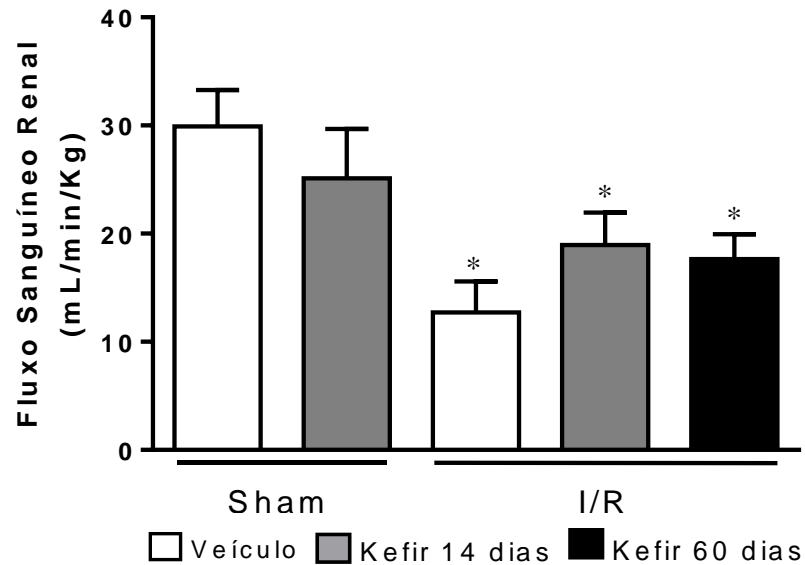


Figura 3 – Avaliação do fluxo sanguíneo renal nos grupos Sham VC (n=6), Sham kefir (n=6), I/R VC (n=6), I/R kefir 14 dias (n=6), I/R kefir 60 dias (n=7). * $p < 0.05$ vs Sham.

4.1.4. Resistência vascular renal

Na figura 4 estão demonstrados os resultados da resistência vascular renal (RVR). Observa-se um aumento da RVR no grupo I/R que recebeu veículo ($9,2 \pm 1,3$ a.u.) quando comparada com os grupos Sham VC ($3,6 \pm 0,5$ a.u.) e Sham kefir ($4,6 \pm 0,5$ a.u.), mostrando que a indução da isquemia aumenta a RVR. O tratamento com kefir demonstrou efeito positivo sobre a hemodinâmica renal, diminuindo a RVR nos animais do grupo I/R kefir 14 dias ($5,5 \pm 0,7$ a.u.). Estatisticamente, os animais tratados por 60 dias não apresentaram melhora da RVR ($7,0 \pm 0,8$ a.u.).

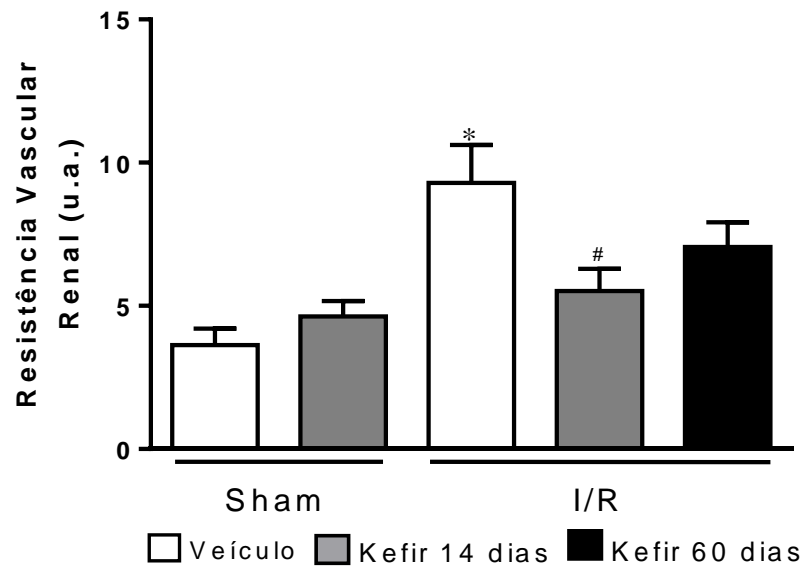


Figura 4 – Avaliação da resistência vascular renal nos grupos Sham VC (n=6), Sham kefir (n=6), I/R VC (n=6), I/R kefir 14 dias (n=6), I/R kefir 60 dias (n=7). *p<0.05 vs Sham, #p<0.05 vs I/R Veículo.

4.2. Avaliação do estresse oxidativo

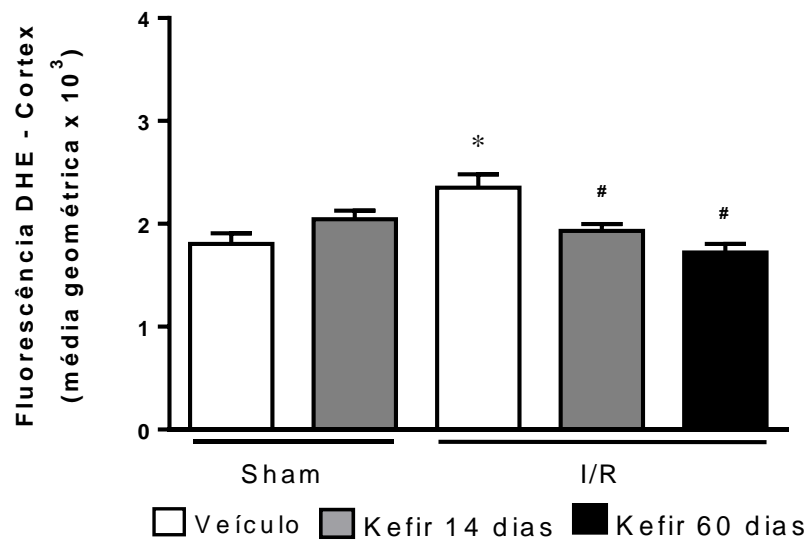
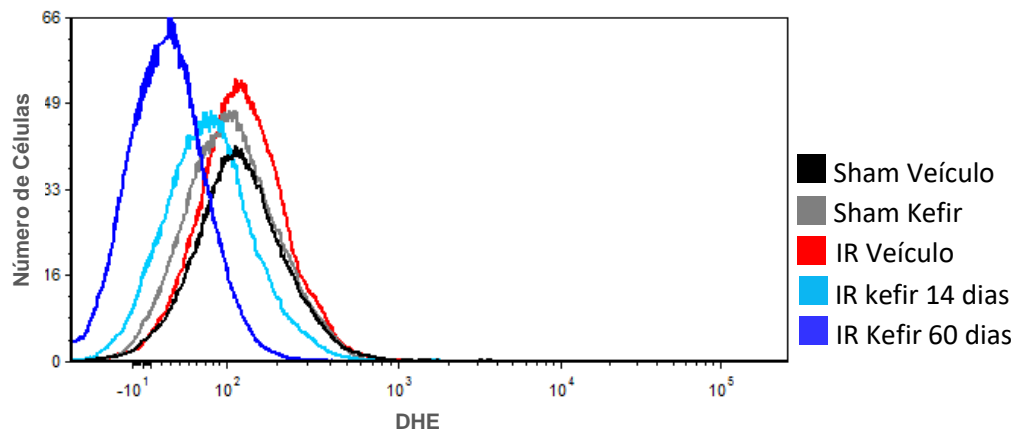
4.2.1. Ânion superóxido

A análise da produção de ânions superóxido foi realizada por meio da quantificação do marcador fluorescente DHE pela citometria de fluxo. A Figura 5 demonstra a quantidade de ânions superóxido tanto no córtex (A), quanto na medula (B) dos animais Sham e I/R que receberam o veículo ou kefir. No córtex renal, observa-se um aumento na fluorescência do DHE nos animais do grupo I/R VC ($2,3 \pm 0,1$ u.a.), comparado aos grupos Sham (VC: $1,8 \pm 0,1$; kefir: $2,0 \pm 0,08$ u.a.). O aumento da produção de ânions superóxido foi prevenido nos grupos I/R que receberam o kefir por 14 dias ($1,9 \pm 0,06$ a.u.) e por 60 dias ($1,7 \pm 0,02$ u.a.).

Na medula renal também foi possível observar aumento significativo na produção de ânions superóxido no grupo I/R VC ($2,7 \pm 0,1$ u.a.), ao ser comparado com os animais Sham (VC $1,8 \pm 0,05$; kefir $1,9 \pm 0,08$). Novamente, a administração de kefir

preveniu a superprodução de ânions superóxido nos grupos que receberam kefir por 14 ($2,1 \pm 0,1$ u.a.) e 60 dias ($1,6 \pm 0,02$ u.a.) quando comparados ao seu veículo, sendo maior essa prevenção nesse último grupo.

A



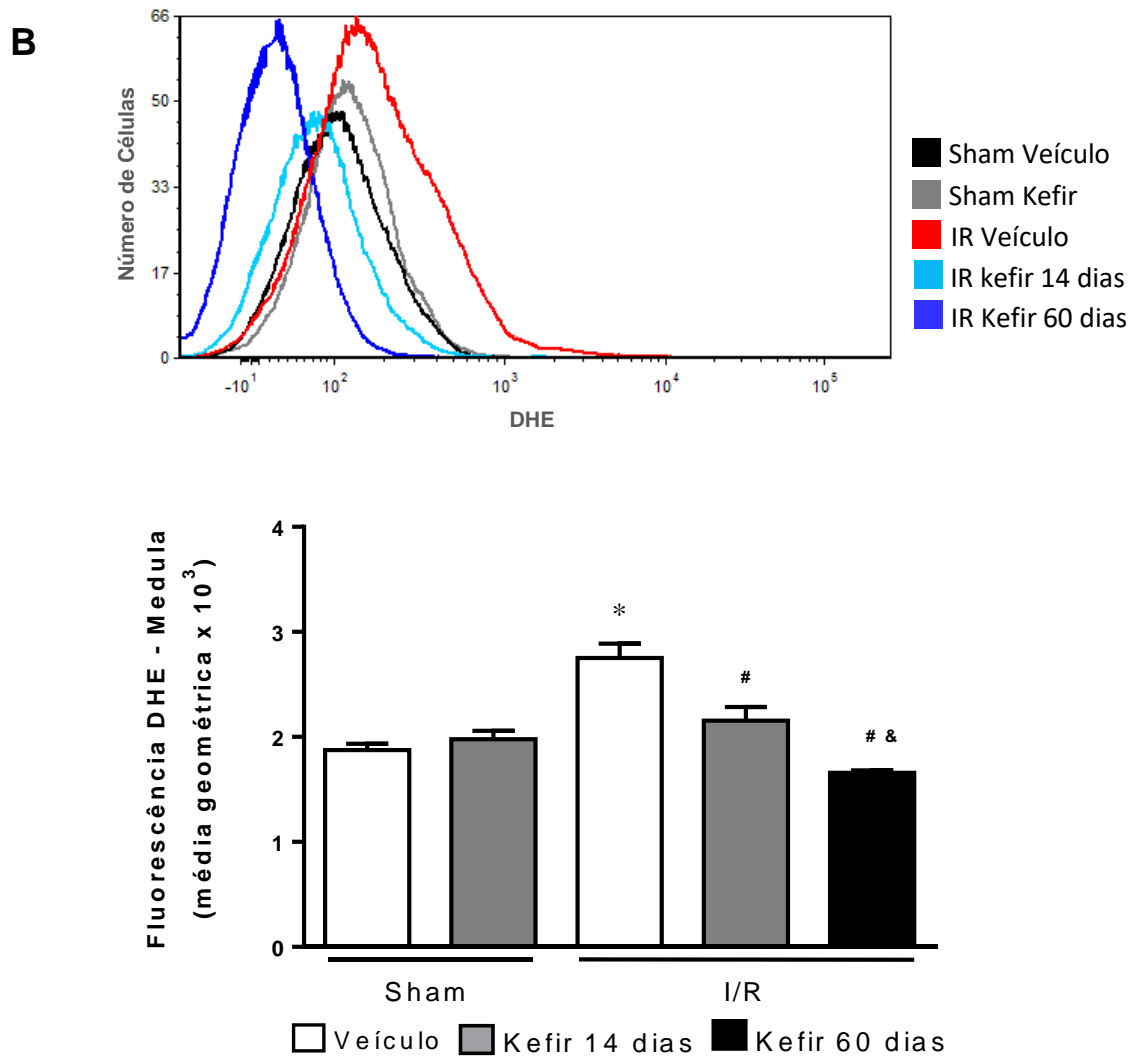


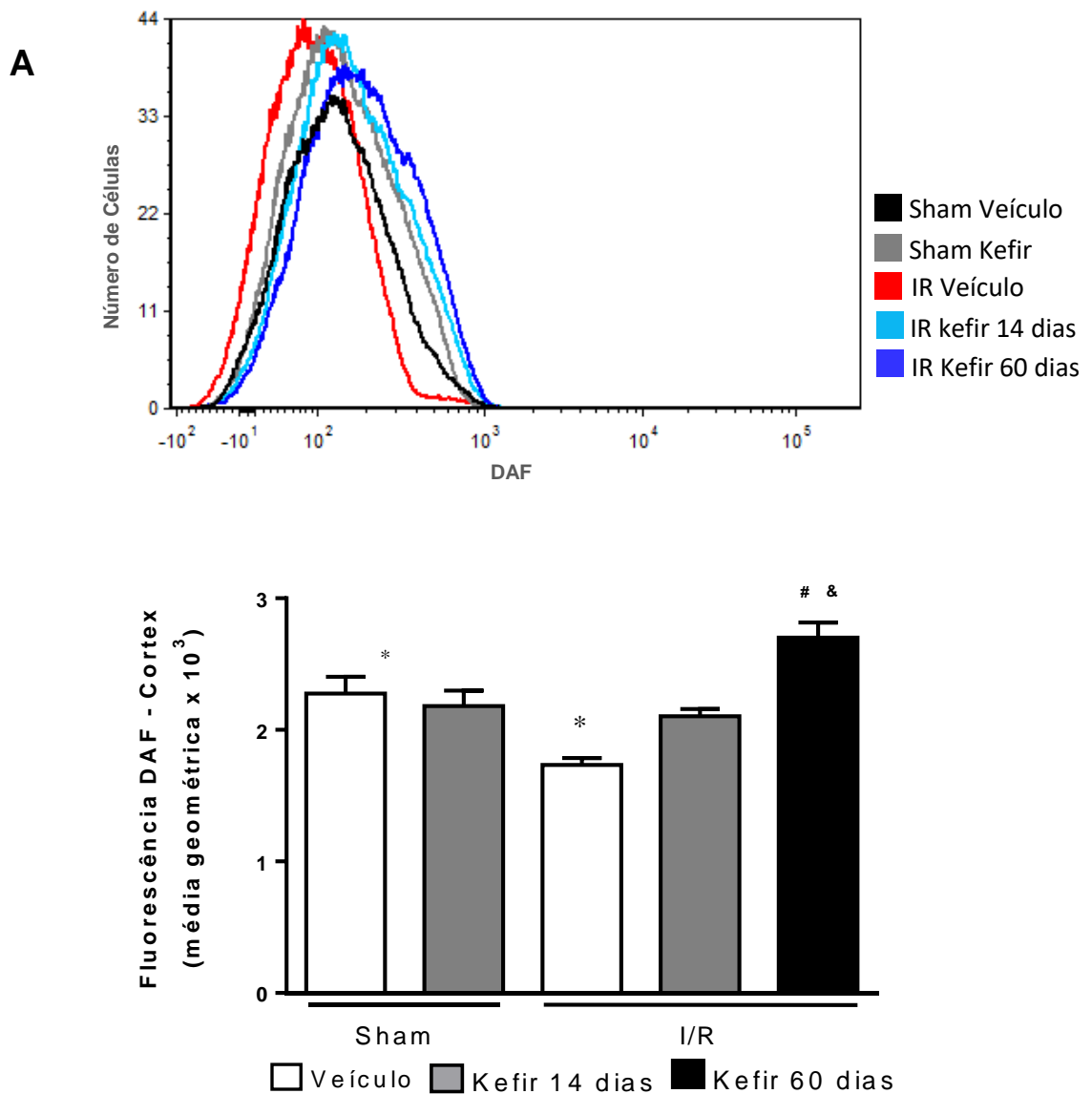
Figura 5 - Produção de ânion superóxido. Histogramas representativos por citometria de fluxo usando DHE e quantificação da produção de óxido nítrico no córtex (A) e medula (B) renal nos grupos Sham VC (n=11), Sham kefir (n=6), I/R VC (n=5), I/R kefir 14 dias (n=11) e I/R kefir 60 dias (n=11). *p<0.05 vs Sham, #p<0.05 vs I/R Veículo e &p<0.05 vs I/R kefir 14 dias.

4.2.2. Óxido Nítrico

Na Figura 6 é possível verificar a quantificação da produção de NO no córtex (A) e medula (B) renal. Ao comparar as células renais corticais dos animais do grupo I/R

VC ($1,7 \pm 0,05$ u.a.), com os animais do grupo Sham (VC: $2,2 \pm 0,1$; kefir: $2,1 \pm 0,1$ u.a.) constata-se uma diminuição significativa da produção de óxido nítrico nos animais I/R, que foi melhorada com a administração do kefir por 60 dias ($2,7 \pm 0,1$ u.a.). Esse grupo teve uma produção de óxido nítrico também maior quando comparado ao grupo Sham VC ($2,2 \pm 0,1$ u.a.) e I/R kefir 14 dias ($2,1 \pm 0,05$ u.a.).

Para o tecido renal medular nota-se uma diminuição significativa na fluorescência do grupo I/R VC ($1,8 \pm 0,05$ u.a.) em comparação aos grupos Sham (VC: $2,3 \pm 0,1$; kefir: $2,3 \pm 0,05$ u.a.), bem como um aumento significativo desse ânion para os grupos I/R tratados com kefir (14 dias: $2,6 \pm 0,09$; 60 dias: $2,6 \pm 0,05$ u.a.).



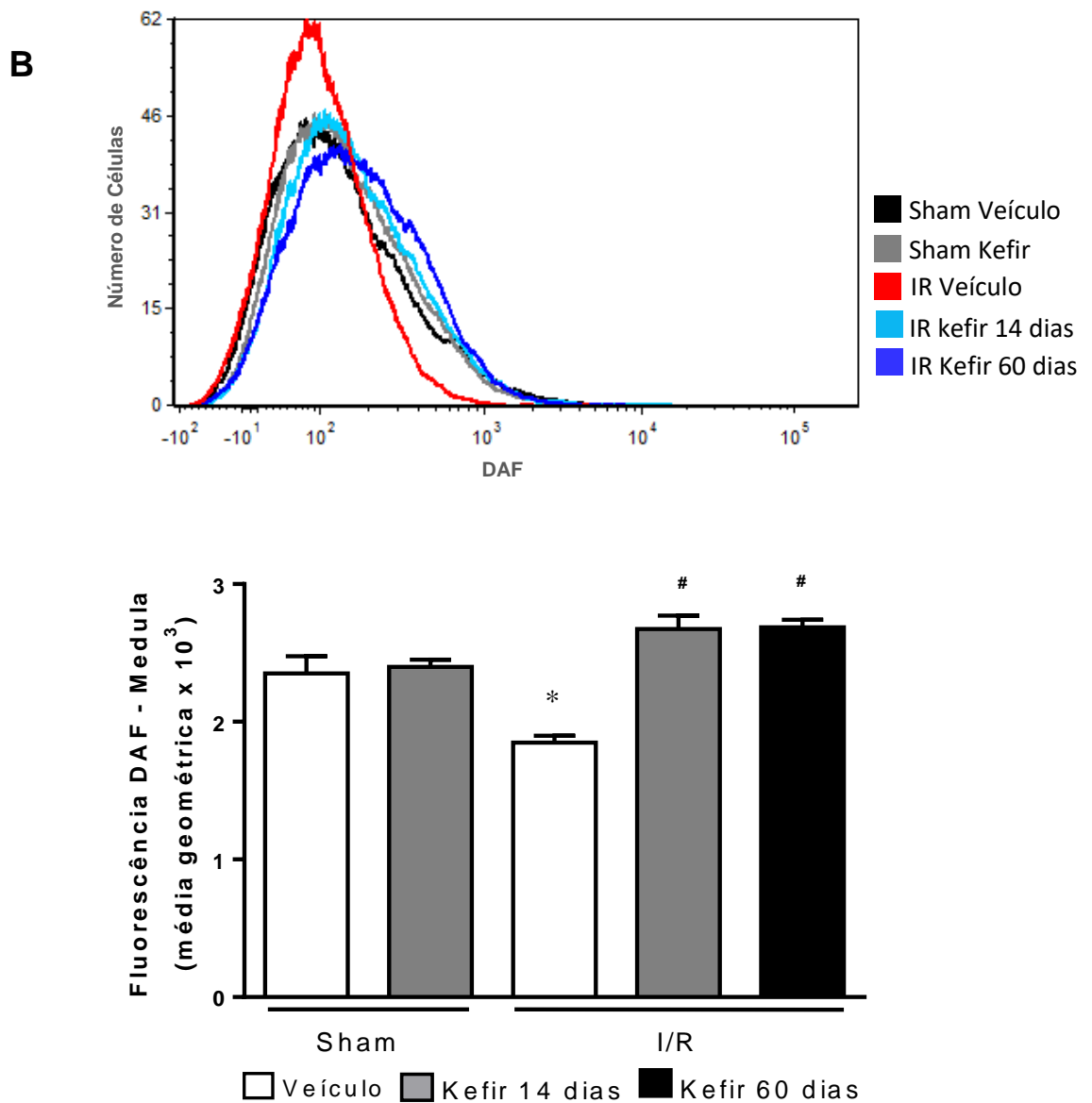


Figura 6 - Produção de óxido nítrico. Histogramas representativos por citometria de fluxo usando DAF e quantificação da produção de óxido nítrico no córtex (A) e medula (B) renal nos grupos Sham VC (n=11), Sham kefir (n=6), I/R VC (n=5), I/R kefir 14 dias (n=11) e I/R kefir 60 dias (n=11). *p<0.05 vs Sham, #p<0.05 vs I/R Veículo e &p<0.05 vs I/R kefir 14 dias.

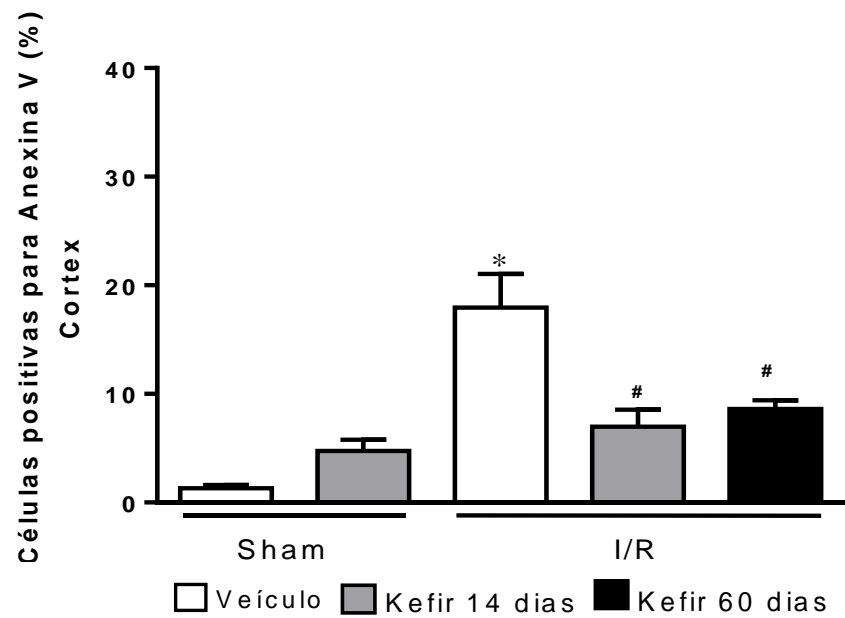
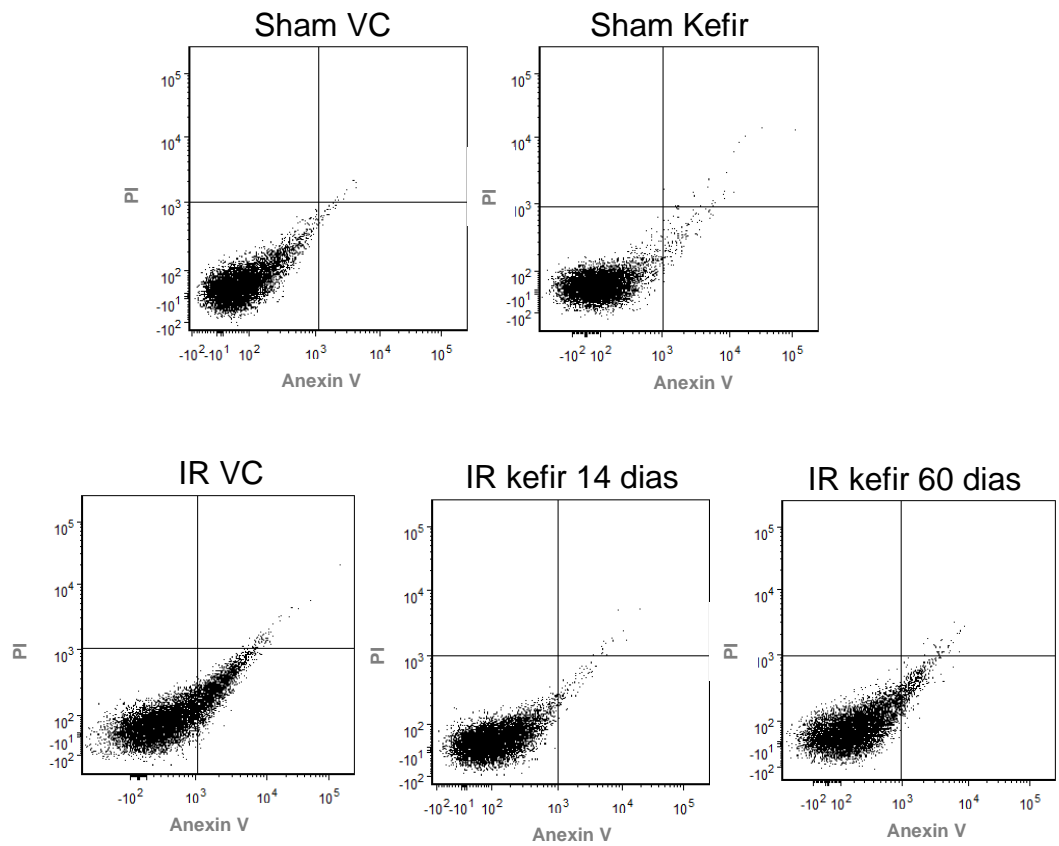
4.3. Apoptose

A Figura 7 demonstra o resultado da apoptose no córtex e na medula renal, por meio da marcação pela Anexina V e PI. Observa-se que no córtex (Figura 8-A) a indução da isquemia (I/R VC: 17,9 ± 3,1%) aumentou o percentual de células em apoptose

quando comparado aos grupos Sham (VC: $1,3 \pm 0,1$; kefir: $4,7 \pm 1,0\%$). O tratamento com kefir por 14 dias ($6,9 \pm 1,5\%$) e por 60 dias ($8,6 \pm 0,7\%$) resultou em significativa redução da apoptose.

A figura 7B demonstra que a I/R aumenta de forma significativa o percentual de células apoptóticas no grupo I/R VC ($20,1 \pm 2,4\%$) quando comparado aos animais do grupo Sham (VC: $1,3 \pm 0,3$; kefir: $4,0 \pm 1,3\%$). É possível notar também que o grupo que recebeu kefir por 60 dias ($5,5 \pm 0,2\%$) exerce um efeito benéfico, o que não é observado para o grupo de 14 dias ($23,4 \pm 1,1\%$).

A



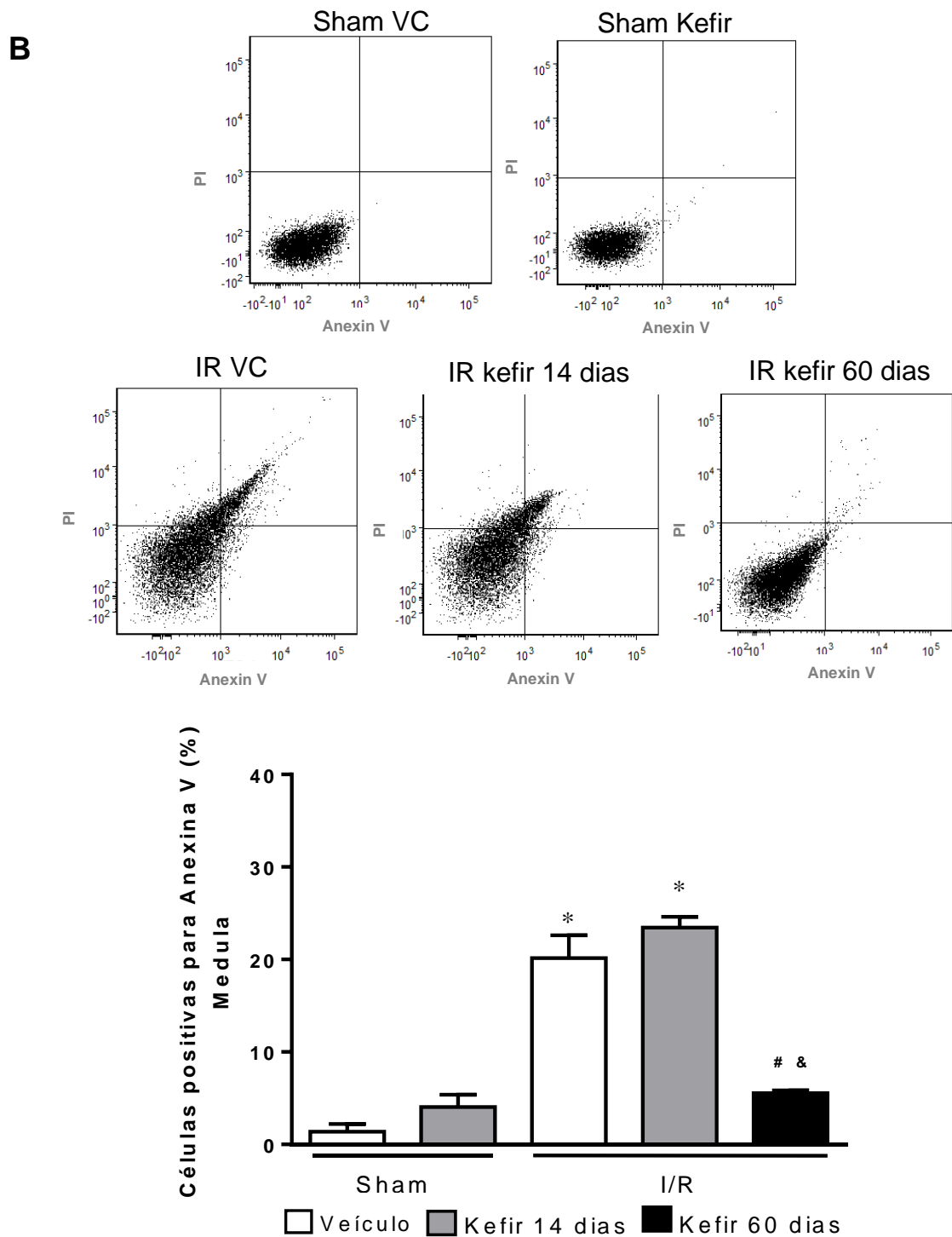


Figura 7 - Detecção de apoptose por citometria de fluxo com Anexina-V e IP. Dot plot representativo da citometria de fluxo de células renais marcadas com Anexina-V e PI e gráfico de barras mostrando a média de porcentagem de células apoptóticas (Q2+Q4) para córtex (A) e medula (B) renal nos diferentes nos grupos Sham VC (n=5), Sham kefir (n=7), I/R VC (n=5), I/R kefir 14 dias (n=4) e I/R kefir 60 dias (n=13). * $p < 0.05$ vs Sham, # $p < 0.05$ vs I/R Veículo e & $p < 0.05$ vs I/R kefir 14 dias.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A LRA é caracterizada pela perda súbita da capacidade dos rins de excretarem metabólitos, concentrar urina, conservar os eletrólitos e manter o balanço hídrico, sendo constantemente diagnosticada em pacientes internados em estado grave (MOORE, BELLOMO, NICHOL, 2012; SHIRIER et al., 2004). Esta doença está associada com a alta morbidade e mortalidade de pacientes com problemas renais (AWADA, EL-SHARIF, 2011). A etiologia da lesão isquêmica renal é complexa e a reperfusão, apesar de ser essencial para a sobrevivência do rim isquêmico, pode causar lesão adicional (CHIAZZA et al., 2015).

A utilização de modelos experimentais pode ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos na LRA. Em nosso estudo utilizamos a isquemia renal de 45 minutos seguida de 24 horas de reperfusão. Este modelo é considerado o mais apropriado para mimetizar as mudanças hemodinâmicas renais que ocorrem em humanos com LRA (SINGH et al., 2012). Williams et al. (1997) investigaram os efeitos de diferentes tempos de reperfusão sobre a lesão renal. A duração da isquemia renal de 45 minutos, através do clampeamento das artérias e veias renais bilaterais, e os níveis de ureia nitrogenada e creatinina foram avaliados no tempo 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 9 e 24 horas e após uma semana de reperfusão renal. Os autores observaram que a lesão renal começou a se estabelecer na quarta hora após a indução da isquemia por 45 minutos, e atingiu o pico na 24^a hora de reperfusão. Entre 22 e 28 horas de reperfusão, Yamamoto et al. (1984) e Arendshorst et al. (1975) observaram que na necrose tubular aguda os efeitos da perfusão são mais evidentes, e que se assemelham a encontrada em rins humanos. Gu et al. (2011) demonstraram que quando a isquemia renal de 40 minutos é seguida por 24 horas de reperfusão ocorre um aumento de mais de 7 vezes dos valores plasmáticos de creatinina e ureia. Em conjunto estes dados reforçam a importância deste modelo experimental no entendimento da fisiopatologia da LRA.

A incidência da LRA varia aproximadamente de 1 a 7%, de acordo com as condições clínicas dos pacientes, sendo maior em unidades de terapia intensiva (UTI) (PONCE et al., 2011). Uchino e colaboradores (2005) realizaram um estudo multicêntrico mostrando que 5,7% dos pacientes internados em UTI evoluem com

LRA e necessidade dialítica. Ainda de acordo com estes autores, a LRA isquêmica está presente em 2% dos pacientes internados, e até 40% nos pacientes das unidades de terapia intensiva, com taxa de mortalidade >50% em pacientes dialisados.

Considerando a importância da LRA e a ausência de alternativas terapêuticas eficazes, o presente estudo teve como objetivo a avaliação do efeito da administração do kefir de leite de vaca previamente à indução da LRA, sobre a função renal de ratos submetidos a isquemia reperusão. Assim, foi possível observar que o tratamento com kefir durante 60 dias resultou em melhora da TFG, redução do stress oxidativo e apoptose, indicando um potencial terapêutico para utilização do kefir na LRA.

Um estudo recente realizado por Yener e colaboradores (2015), avaliou o efeito do kefir na lesão provocada pela isquemia e reperusão, dentre elas a IR renal, em ratos. De maneira similar aos nossos resultados, os autores observaram que o grupo submetido a cirurgia de IR apresentou redução na função glomerular renal e que a administração do kefir preveniu estas alterações. Entretanto, algumas diferenças entre os estudos devem ser destacadas: 1) os autores realizaram a isquemia reperusão através da ligadura da aorta abdominal, o que também causa alterações na fisiologia pulmonar; 2) os autores avaliaram a função renal através dos valores de creatinina e ureia plasmática e 3) os autores avaliaram o stress oxidativo através da quantificação da peroxidação lipídica. Em nosso estudo, utilizamos o modelo de isquemia da artéria renal por 45 minutos, seguida de reperusão pelo período de 24 horas. Avaliamos a função renal através do clearance de inulina, que é considerado o padrão ouro para a avaliação da função renal, e além da taxa de filtração glomerular avaliamos também fluxo plasmático e sanguíneo renal, e resistência vascular renal. Além disso, em nosso estudo quantificamos a produção de ânions superóxido e óxido nítrico.

Também corroborando o potencial benéfico dos probióticos sobre a função renal, Ranganathan e colaboradores (2010) realizaram um estudo com 46 pacientes ambulatoriais diagnosticados com doença renal, que receberam em sua dieta a adição de cápsulas de gel com probióticos. Os pacientes que receberam a cápsula contendo os probióticos apresentaram redução dos níveis plasmáticos de ureia e da qualidade de vida relatada pelos próprios pacientes. Um estudo realizado por

Kanbak e colaboradores (2014) demonstrou que o tratamento com kefir protege contra o dano renal induzido por dieta hipersódica em ratos. Punaro e colaboradores (2014), analisaram a ureia, creatinina, proteinúria, óxido nítrico (NO), ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína C-reativa (CRP) em ratos diabéticos tratados com kefir e observaram que o seu consumo está associado a melhora destes parâmetros. Di Cerbo e colegas (2016) observaram que os lactobacilos são agentes capazes de se integrar na microbiota intestinal do hospedeiro promover a oxalúria, e impedir ou diminuir a incidência e gravidade da formação de pedra nos rins. Yacoub e colaboradores (2016) observaram que o consumo regular de probióticos está relacionado a diminuição da proteinúria na doença renal. Em conjunto, estes dados demonstram o potencial efeito protetor do kefir sobre diversos modelos de injúria renal.

Sabe-se que o estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo. A atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione S-transferase e glutathione peroxidase constituem sistemas de defesa do organismo contra o aumento do estresse oxidativo. Estas enzimas decompõem as EROs, sendo a superóxido dismutase a conversora de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, e a catalase responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (POWERS, JACKSON, 2008). Estudos demonstram que a defesa antioxidante pode ser alterada sob condições de enfermidades e assim, culminando em produção elevada das EROs, desempenhando um papel crucial na determinação de danos oxidativo tecidual (PRAKASH, et al., 2007; NAUTIYAL, et al., 2008_b).

O dano oxidativo tecidual está presente de maneira significativa na I/R renal, que desencadeia uma resposta inflamatória e envolve a formação de radicais livres de oxigênio, geração de citocinas inflamatórias, disfunção mitocondrial, dentre outros (AWADA; EL-SHARIF, 2011). Nesse estudo, foi quantificada a produção renal de ânions superóxido e óxido nítrico intra-renais, e constatou-se que o kefir foi capaz de reduzir a produção de ânions superóxido e aumentar a produção de óxido nítrico no córtex e medula renal, indicando que possa ser um provável mecanismo pelo qual o kefir exerça um efeito protetor sobre a perda de função renal induzida pela I/R. De acordo com dados do nosso laboratório, Friques et al. (2015) demonstraram o efeito

antioxidante do kefir na produção das ROS em células de anéis de aorta. Teruya et al (2002) demonstraram que o leite fermentado por Kefir reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estimula a captação de glicose por células de músculo esquelético.

Os mecanismos pelos quais o kefir parece reduzir o stress oxidativo incluem redução da expressão da iNOS (ASTRUP, 2014) e aumento da atividade de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (BELLOMORO et al., 2014). De acordo com estes dados, Guven e colaboradores (2015), avaliaram os efeitos protetores do kefir nos danos causados pela isquemia e reperfusão medular espinhal e observaram que o pré-tratamento com o kefir reduzia o estresse oxidativo por aumentar atividade da catalase e superóxido dismutase, conferindo um papel neuroprotetor. De acordo com estes dados, Kumar e colaboradores (2012_b) observaram que os animais que receberam *Lactobacillus plantarum* AS1 (10^9 ufc/mL) apresentaram aumento da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione-S-Transferase quando comparado aos animais controle. Em outro estudo, o leite fermentado adicionado de *Lactobacillus acidophilus* LaVK2 e *Lactobacillus plantarum* Lp9 (2×10^9 ufc/g de cada estirpe) foi capaz de aumentar a atividade da enzima glutathione S-transferase no fígado e no cólon dos animais tratados (MOHANIA et al., 2013). Nos rins, Yener e colaboradores (2015) demonstraram que a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase aumentam a sua atividade após o tratamento com kefir. Adicionalmente, como outros probióticos, o kefir possui grandes quantidades de bactérias do ácido láctico, o que lhe confere propriedades antioxidantes (LIN et al., 1995), e os peptídeos bioativos liberados por bactérias proteolíticas durante a fermentação do leite podem atuar como varredores ROS, reduzindo o estresse oxidativo (KORHONEN e PIHLANTO, 2006).

Nossos resultados também demonstraram que o tratamento com kefir restaurou a produção de óxido nítrico (NO) renal que encontrava-se diminuída pela I/R. O NO é um importante vasodilatador que atua na homeostase do fluxo sanguíneo e excreção renal. O bloqueio da síntese de NO leva a diminuição da perfusão renal e diminuição da eliminação de sódio (FILHO, ZILBERSTEIN, 2000). A redução da resistência vascular renal nos grupos tratados com kefir pode ter ocorrido devido ao aumento da síntese/biodisponibilidade de NO.

Durante a isquemia o NO protege o tecido isquêmico, por ter ação vasodilatadora. Na fase de reoxigenação/reperfusão, o NO pode reagir com os radicais superóxido, impedindo a reação em cadeia para a produção adicional de espécies reativas de oxigênio (ROS), e, assim, reduzir a ativação de leucócitos e a formação de mediadores inflamatórios. No entanto, o excesso da produção de NO pode ser prejudicial devido à sua capacidade para gerar o peroxinitrito, o qual pode causar a peroxidação lipídica das membranas celulares (CHIAZZA et al., 2015).

A apoptose é o suicídio regulado de morte celular, no qual as células ativam enzimas que degradam suas proteínas nucleares e citoplasmáticas, e seu próprio DNA. Assim, a apoptose é uma via que elimina células geneticamente alteradas ou lesadas de modo irreparável (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Diversos estudos têm reforçado o papel da apoptose na progressão da injúria renal (MAENPAA et al. 2008; ANDRADE-OLIVEIRA, et al., 2015; ZHU et al., 2016). De acordo com estes dados, um estudo recente do nosso laboratório realizado por Freitas et al. (2015) demonstrou a redução da apoptose e melhora na função renal em ratos submetidos à isquemia reperfusão tratados com a lectina de *Dioclea violacea*. Outro estudo demonstrou que a deleção específica de duas proteínas pró-apoptóticas, Bax e Bcl-2, nas células tubulares renais resultou em efeito protetor renal em camundongos submetidos à isquemia reperfusão, reforçando o papel importante do processo de apoptose na LRA (WEI et al., 2013).

No nosso estudo demonstramos que os animais tratados com kefir apresentaram também redução do número de células em apoptose. Entretanto, os efeitos de produtos fermentados do leite sobre a apoptose permanecem controversos. Estudos demonstraram que o tratamento com kefir pode tanto estimular (JALALI et al., 2016) quanto inibir (NAGIRA et al., 2002) a apoptose. Guven e colaboradores (2015) demonstraram que ratos submetidos a isquemia medular espinhal, o tratamento com kefir reduziu o percentual de células neuronais em apoptose. Por outro lado Chen, Chan e Kubow (2007) observaram que o extrato do kefir contém substâncias que aumentam a apoptose de células de câncer de mama, e que tal efeito pode ser útil na prevenção ou no tratamento do mesmo. Mamdooh e Nouran (2015), investigaram o efeito do *Lactobacillus kefiri* na apoptose de células cancerosas gástricas e células do câncer de mama, e observaram que para as células gástricas o kefir estimulou a apoptose, porém não apresentou efeito apoptótico nas células do câncer de mama.

Sabe-se que a ativação de caspases é um dos principais mecanismos indutores de apoptose em diferentes tipos celulares, incluindo as células tubulares. Entretanto, o tratamento com kefir em ratos com hipertensão induzida por sal não foi capaz de modificar a atividade de enzimas semelhantes a caspase (KANBAK et al., 2014), indicando que esta via não parece estar envolvida nos efeitos protetores do kefir. É importante ressaltar que diferentes proteases, como a catepsina B, parecem estar envolvidas nos efeitos *downstream* das caspases, como por exemplo na apoptose induzida por TNF (FOGHSGAARD et al., 2001). Neste âmbito, estudos demonstraram que o kefir foi capaz de reduzir a concentração plasmática de TNF- α (YENER et al., 2015) e a concentração tecidual renal de catepsina B (KANBAK et al., 2014), indicando que este mecanismo pode estar envolvido no efeito protetor do kefir sobre a apoptose.

Um outro fator importante envolvido na progressão da LRA é a inflamação. Apesar de não termos quantificado nenhuma citocina pró ou anti-inflamatória, acreditamos que parte dos efeitos protetores do kefir possa ter ocorrido por diminuir a inflamação. Estudos recentes têm mostrado que os probióticos podem reduzir o processo inflamatório pela estabilização do ambiente microbiano intestinal, diminuindo a inflamação sistêmica e estimulando a atividade de células natural *killer* (NK) (MATSUMOTO, 2010).

Estudos demonstram que o kefir possui efeitos benéficos sobre a promoção de respostas imunes mediadas por células contra tumores e também contra infecções patogênicas intracelulares (HONG et al. 2009). Corroborando o efeito anti-inflamatório do kefir, Senol e colaboradores (2015) observaram em um modelo experimental de colite que o tratamento com kefir reduziu a atividade da mieloperoxidase, e os níveis de TNF- α e iNOS, indicando redução da inflamação. De acordo com estes dados, Hadisaputro et al (2012) demonstraram que, em ratos com diabetes induzida por streptozotocina, o tratamento com kefir durante 30 dias reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α e aumento do nível da citocina anti-inflamatória IL-10. Em camundongos com alergia induzida por ovoalbumina a expressão de p-JNK, JNK 1/2, p-NKkB, TNF- α também foram diminuídos quando os animais foram tratados com kefir (Wang et al., 2012). Em conjunto, estes dados reforçam o potencial anti-inflamatório do kefir, entretanto os

mecanismos pelos quais os probióticos modulam o sistema imunológico, ainda não são inteiramente compreendidos (MATSUMOTO, 2010) e mais estudos serão necessários para melhor esclarecer estes efeitos.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nesse estudo foi demonstrado que o kefir possui efeitos benéficos na lesão renal aguda induzida pela isquemia reperusão por clampeamento bilateral das artérias renais. Esta melhora da função renal parece estar ligada à redução da apoptose e diminuição do estresse oxidativo em células renais. Estes achados sugerem que o kefir poderia ser usado como uma abordagem co-adjuvante no tratamento da lesão renal aguda.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE (ANVISA). **Portaria nº 389, de 30/04/99**. 1999;

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4ª Ed. New York, 2002;

AMER, M. N.; MANSOUR, N. M.; AHMED, I.; EL-DIWANY; INSAF, E. D.; FERIAL, M. R. **Isolation of probiotic lactobacilli strains harboring L-asparaginase and arginine diiminase genes from human infant feces from their potential application in cancer prevention**. Ann. Microbiol, v. 63, p. 1121-1129, 2013;

ANDRADE-OLIVEIRA, V.; AMANO, M. T.; CORREA-COSTA, M.; CASTOLDI, A.; FELIZARDO, R. J.; DE ALMEIDA, D. C.; BASSI, E. J.; MORAES-VIEIRA, P. M.; HIYANE, M. I.; RODAS, A. C.; PERON, J. P.; AGUIAR, C. F.; REIS, M. A.; RIBEIRO, W. R.; VALDUGA, C. J.; CURI, R.; VINOLO, M. A.; FERREIRA, C. M.; CÂMARA, N. O. **Gut Bacteria Products Prevent AKI Induced by Ischemia-Reperfusion**. J Am Soc Nephrol. v. 26, n. 8, p. 1877-88, 2015;

ARENDSHORST, W. J.; FINN, W. F.; GOTTSCHALK, C. W. **Pathogenesis of acute renal failure following temporary renal ischemia in the rat**. Circ Res. V. 37, p. 558-68, 1975;

ASTRUP, A. **Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies**. Am J Clin Nutr. v. 99, p. 1235-42, 2014;

AWADA, A. S., EL-SHARIF, A. A. **Curcumin immune-mediated and anti-apoptotic mechanisms protect against renal ischemia/reperfusion and distant organ induced injuries**. International Immunopharmacology, v. 11, n. 8, p. 992-996, 2011;

BASTOS, M. G.; BREGMAN, R.; KIRSZTAJN, G. M. **Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável**. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 56, n. 2, p. 248-53, 2010;

BELLOMORO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J. A.; MEHTA, R. L.; PALEVSKY, P. **Acute Dialysis Quality Initiative workgroup**. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. Crit Care. v. 8, n. 4, p. 204-12, 2014;

BETZ, B.; SCHNEIDER, R.; KRESS, T.; SCHICK, M. A.; WANNER, C.; SAUVANT, C. **Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury**. PPAR Research, p. 219-319, 2012;

BOIRIVANT, M.; STROBER, W. **The mechanism of action of probiotics**. Current Opinion in Gastroenterology. v. 23, n. 6, p. 679-692, 2007;

BONVENTRE, J. V.; ZUK, A. **Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease?** *Kidney International*. v. 66, n. 2 , p. 480 – 485, 2004;

BRÖKER LE; KRUYT FAE; GIACCONE G. **Cell death independent of caspases: a review.** *Clin Cancer Res*. v. 11, p. 3155-162, 2005;

BURDMANN, E. A.; ÁVILA, M. O. N.; YU, L. **Insuficiência renal aguda: Tratamento conservador da necrose tubular aguda.** *J Bras Nefrol*. V. 20, p. 478-483, 1998;

BUSSMANN, A. R.; MARTON FILHO, M. A.; MÓDOLO, M. P.; MÓDOLO, R. P.; AMADO, P. DOMINGUES, M. A. C.; CASTIGLIA, Y. M. M.; & MÓDOLO, N. S. P. **Effect of allopurinol on the kidney function, histology and injury biomarker (NGAL, IL 18) levels in uninephrectomised rats subjected to ischaemia-reperfusion injury.** *Acta Cir. Bras.*, São Paulo, v. 29, n. 8, p. 515-521, 2014;

CARTER, W.O.; NARAYANAN, P. K.; ROBINSON, J.P. **Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells Wayne.** *Journal of Leukocyte Biology*, v. 55, p. 253-258, 1994;

CHEN, C.; CHAN, H. M.; KUBOW, S. **Kefir extracts suppress in vitro proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells but not normal mammary epithelial cells.** *J Med Food*, v. 10, n. 3, p. 416-422, 2007;

CHIAZZA, F.; CHEGAEV, K.; ROGAZZO, M.; CUTRIN, J. C.; BENETTI, E.; LAZZARATO, L; FRUTTERO R.; COLLINO, M. **A Nitric Oxide-Donor Furoxan Moiety Improves the Efficacy of Edaravone against Early Renal Dysfunction and Injury Evoked by Ischemia/Reperfusion.** *Oxidativo Medicine and Cellular Longevidade*. v. 7, n. 12, p. 2573–2588, 2015;

COSTA, J. A. C; VIEIRA-NETO, O. M.; MOYSÉS NETO, M. **Acute renal failure.** *Medicina, Ribeirão Preto*. v. 36, p. 307-324, 2003;

DESAGHER, S.; MARTINO, J. C. **Mitochondria as the central control point of apoptosis.** *Trends Cell Biol*. v. 10, p. 369-377, 2000;

DEVARAJAN, P. **Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury.** *Journal American Sociolog Nephrology*. v. 17, n. 6, p. 1503-20, 2006;

DI CERBO, A.; PALMIERI, B.; APONTE, M.; MORALES-MEDINA, J. C.; IANNITTI, T. **Review: Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli.** *J Clin Pathol*. v.69, n. 3, p. 187 – 203, 2016;

EATON, D.C.; POOLER, J.P. **Fisiologia Renal de Vander.** 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006;

EHLERS, P. I.; KIVIMÄKI, A. S.; TURPEINEN, A. M.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. **High blood pressure-lowering and vasoprotective effects of milk products in experimental hypertension.** *Br J Nutr*. v. 106, n. 9, p. 1353-63, 2011;

ELMORE, S. **“Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.”**Toxicologic pathology, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007;

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos Lácteos: aspectos bioquímicos e tecnológicos. Caderno didático – UFV-Viçosa-MG.** N. 43, p.112. 2005;

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B., **Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 46, n. 3, 2000;

FOGHSGAARD, L.; WISSING, D.; MAUCH, D.; LADEMANN, U.; BASTHOLM, L.; BOES, M.; ELLING, F.; LEIST, M.; JÄÄTTELÄ, M. **Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor.** Journal Cell Biology. V. 153, n. 5, p. 999-1010, 2001;

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food.** Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting London, Ontario, Canada. p.8, 2002;

FREITAS, F. P.; PORTO, M. L.; TRANHAGO, C. P.; PIONTKOWSKI, R.; MIGUEL, E. C.; MIGUEL, T. B.; MARTINS, J. L.; NASCIMENTO, K. S.; BALARINI, C. M.; CAVADA, B. S.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C.; GAVA, A. L. **Dioclea violacea lectin ameliorates oxidative stress and renal dysfunction in an experimental model of acute kidney injury.** Am J Transl Res. v. 15, n. 7, p. 2573-88, 2015;

FRIQUES, A. G.; ARPINI, C. M.; KALIL, I. C.; GAVA, A. L.; LEAL, M. A; PORTO, M. L.; NOGUEIRA, B. V.; DIAS, A. T.; ANDRADE, T. U.; PEREIRA, T. M.; MEYRELLES, S. S.; CAMPAGNARO, B. P; VASQUEZ, E. C. **Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats.** Journal Transl Med. v. 30, n. 13, p. 390, 2015;

FUHR, J.; KACZMARCZYK, J.; KRUTTGEN, C.D. **A simple colorimetric method of inulin determination in renal clearance studies on metabolically normal subjects and diabetics.** Klin Wochenschr. v. 33, p. 729-30, 1955;

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. **Morte Celular por apoptose.** Revista Brasileira de Cancerologia. v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007;

GU, J.; SUN, P.; ZHAO, H.; WATTS, H. R.; SANDERS, R. D; TERRANDO, N.; XIA, P.; MAZE, M.; MA, D. **Dexmedetomidine provides renoprotection against ischemia-reperfusion injury in mice.** Crit Care. v. 15, p. 153, 2011;

GUELER, F.; GWINNER W.; SCHWARZ, A.; HALLER, H. **Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury.** Kidney International. v. 66, n. 2, p. 523-27, 2004;

GUPTA, S. **Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review).** Int J Oncol. V. 22, p. 15-20, 2003;

GUVEN, M.; AKMAN, T.; YENER, A. U.; SEHITOGLU, M. H.; YUKSEL, Y.; COSAR, M. **The Neuroprotective Effect of kefir on Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Injury in Rats** Journal of Korean Neurosurgical Society. v. 57, n. 5, p. 335-341, 2015;

GUZEL-SEYDIM, Z.; KOK-TAS, T.; GRENE, A. K. **Review: functional properties of kefir**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. V. 51, n. 3, p. 261-268, 2011;

HADISAPUTRO, S.; DJOKOMOELJANTO, R. R.; SOESATYO, M. H. **The effects of oral plain kefir supplementation on proinflammatory cytokine properties of the hyperglycemia Wistar rats induced by streptozotocin**. Acta Med. Indones. V. 44, p. 100-104, 2012;

HEYMAN, S. N.; ROSENBERGER, C.; ROSEN, S. **Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths-the proximal vs. distal hypoxic tubular injury debate revisited**. Kidney Int. V. 77, p. 9-16, 2010;

HONG, W. S.; CHEN, H. C.; CHEN, Y. P.; CHEN, M. J. **Efeitos do sobrenadante kefir e bactérias lácticas isoladas a partir de grãos de kefir na produção de citocinas por macrófagos**. Int J. Dairy. v. 19, p. 244-251, 2009;

HONG, W. S.; CHEN, Y. P.; DAI, T. Y.; HUANG, E. M.; CHEN, M. J. **Effect of heat-inactivated kefir-isolated Lactobacillus kefirianofaciens M1 on preventing an allergic airway response in mice**. J Agric Food Chem. v. 59, n. 16, p. 9022-31, 2011;

HUSEINI, H. F., RAHIMZADEHB, G., FAZELI, M. R., MEHRAZMAD, M., SALEHI, M. **Evaluation of wound healing activities of kefir products**. Burns, v. 38, n. 5, p. 719-23, 2012;

JALALI, F.; SHARIFI, M.; SALEHI, R. **kefir induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute erythroleukemia**. Medice Oncology. v. 33, n. 1, p. 7, 2016;

KANBAK, G.; UZUNERB, K.; KUŞAT OL, K.; OĞLAKÇI, A.; KARTKAYA, K.; ŞENTÜRKÇ, H. **Effect of kefir and low-dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in unhypertensive rats with 4 weeks salt diet**. v. 36, n. 1, 2014;

KDIGO **Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury**. Official Journal of the International Society of Nephrology - Kidney International Supplements, v. 2, n. 1, p. 1–138, 2012;

KLIPPEL, B. F.; DUEMKE, L. B.; LEAL, M. A.; FRIQUES, A. G.; DANTAS, E. M.; DALVI, R. F.; GAVA, A. L.; PEREIRA, T. M.; Andrade, T. U.; Meyrelles, S. S.; Campagnaro, B. P.; Vasquez, E. C. **Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats**. Front Physiol. v. 7, n. 7, p. 211, 2016;

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. **Bioactive peptides: production and functionality**. *International Dairy Journal*. v. 16, p. 945–960, 2006;

KUMAR, R. S.; KANMANI, P.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; THIRUNAVUKKARASU, C.; ARUL, V. **Lactobacillus plantarum AS1 isolated from south indian fermented food Kallappam suppress 1,2-dimethylhydrazine (dmh)-induced colorectal cancer in male wistar rats**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 166, p. 620–631, 2012^b;

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins, Patologia Básica**. [tradução de Coana, C., et al. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013;

LAMEIRE, N. H.; VANHOLDER, R. **Pathophysiology of ischaemic acute renal failure**. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. v. 18, n.1, p. 21-36, 2004;

LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. S. **Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage**. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013;

LEONARD, M. O.; HANNAN, K.; BURNE, M. J.; LAPPIN, D. W.; DORAN, P.; COLEMAN, P.; STENSON, C.; TAYLOR, C. T.; DANIELS, F.; GODSON, C.; PETASIS, N. A.; RABB, H.; BRADY, H. R. **15-Epi-16-(Para-Fluorophenoxy)-Lipoxin A4-Methyl Ester, a Synthetic Analogue of 15-epi-Lipoxin A4, Is Protective in Experimental Ischemic Acute Renal Failure**. *J Am Soc Nephrol*. v. 13, p. 1657–1662, 2002;

LIN, M. Y. **The beneficial effect of lactic acid bacteria**. *Journal Chin Nutr Sociation*. v. 20, p. 367-380, 1995;

MAENPAA, C. J.; SHAMES, B. D.; VAN WHY, S. K.; JOHNSON, C. P.; NILAKANTAN, V. **Oxidant-mediated apoptosis in proximal tubular epithelial cells following ATP depletion and recovery**. *Free Radic Biol Med*. V. 44, p. 518-526, 2008;

MAMDOOH, G.; NOURAN, F. **Selective induction of apoptosis in human gastric cancer cells by Lactobacillus kefir (PFT), a novel kefir product**. *Oncol Rep*. V. 34, p. 1659-1666, 2015;

MATSUMOTO, K.; TAKADA, T.; SHIMIZU, K.; MORIYAMA, K.; KAWAKAMI, K.; HIRANO, K.; KAJIMOTO, O.; NOMOTO, K. **Efeitos de uma bebida de leite fermentado probiótico contendo Lactobacillus casei Shirota tensão na frequência da defecação, microbiota intestinal, e para o ambiente intestinal de indivíduos saudáveis com fezes moles**. *J. Biosci. Bioeng*. v. 110, p. 547-552, 2010;

MEHTA, R. L.; KELLUM, J. A.; SHAH, S. V.; MOLITORIS, B. A.; RONCO, C.; WARNOCK, D. G.; LEVIN, A.; **Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury**. *Crit Care*, 2007;

MOLITORIS, B. A.; SUTTON, T. A. **Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure.** *Kidney Int.* v. 66, p. 496-499, 2004;

MONGA, J.; PANDIT, S.; CHAUHAN, R. S.; CHAUHAN, C. S.; CHAUHAN, S. S.; SHARMA, M. **Growth inhibition and apoptosis induction by (+)-cyanidan-3-ol in hepatocellular carcinoma.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, p. 68710, 2013;

MOORE, E. M.; BELLOMO, R.; NICHOL, A. D. **The meaning of acute kidney injury and its relevance to intensive care and anaesthesia.** *Anaesthesia and Intensive Care*, v. 40, n. 6, p. 929–948, 2012;

NAGIRA, T.; NARISAWA, J.; TERUYA, K.; KATAKURA, Y.; SHIM, S. Y.; KUSUMOTO, K.; TOKUMARU, S.; TOKUMARU, K.; BARNES, D. W.; SHIRAHATA, S. **Suppression of UVC-induced cell damage and enhancement of DNA repair by the fermented milk, kefir.** *Cytotechnology*. v. 40, n. 1-3, p. 125-37, 2002;

NAUTIYAL, C. S.; GOVINDARAJAN, R.; LAVANIA, M.; PUSHPANGADAN, P. **Novel mechanism of modulating natural antioxidants in functional foods: involvement of plant growth promoting Rhizobacteria** *J Agric Food Chem.* v. 56, n. 12, p. 4474-81, 2008_a;

NAUTIYAL, K. M.; RIBEIRO, A. C.; PFAFF, D. W.; SILVERA, R. **Brain mast cells link the immune system to anxiety-like behavior.** *Proc Proceedings of the National Academy of Sciences.* v. 18, p. 105(46), 2008_b;

OLIVEIRA, F. C.; ALVES, M. D. S.; BEZERRA, A. P. **Co-morbidades e mortalidade de pacientes com doença renal: atendimento terceirizado de nefrologia.** *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 22, p. 476-80, 2009;

OTLES, S.; CADINGI, O. **kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects.** *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 2, p. 54-59, 2003;

PONCE, D.; ZORZENON, C. P. F.; SANTOS, N. Y.; TEIXEIRA, U. A.; BALBI, A. L. **Injúria renal aguda em unidade de terapia intensiva: estudo prospectivo sobre a incidência, fatores de risco e mortalidade.** *Revista brasileira de terapia. Intensiva.* v. 23, n.3, 2011;

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. **Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production.** *Physiological Reviews*, v.88, p.1243–76, 2008;

PRAKASH, D., DURU, S.; UPADHYAY, G.; SINGH, B. N. **Total phenol, antioxidant and frree radical savenging activities of some medicinal plants.** *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* v. 58, p. 18-28, 2007;

PUNARO, G. R.; MACIEL, F. R.; RODRIGUES, A. M.; ROGERO, M. M.; BOGSAN, C. S.; OLIVEIRA, M. N.; IHARA, S. S.; ARAUJO, S. R.; SANCHES, T. R.; ANDRADE, L. C.; HIGA, E. M. **Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress.** *Nitric Oxide.* v. 15, n. 37, p. 53-60, 2014;

RAMESH, G.; REEVES, W. B. **Inflammatory cytokines in acute renal failure.** *Kidney Int Suppl.* v. 91, p. S56–S61, 2004;

RANGANATHAN, N., RANGANATHAN, P., FRIEDMAN, E. A., JOSEPH, A., DELANO, B., GOLDFARB, D. S., TAM, P., RAO, A. V., ANTEYI, E., MUSSO, C.G. **Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease.** *Adv Ther.*, v. 27, n. 9, p. 634-47, 2010;

ROELOFS, J. J.; ROUSCHOP, K. M.; LEEMANS, J. C.; CLAESSEN, N.; DE BOER, A. M.; FREDERIKS, W. M.; LIJNEN, H. R.; WEENING, J. J.; FLORQUIN, S. **Tissue-type plasminogen activator modulates inflammatory responses and renal function in ischemia reperfusion injury.** *Journal American Soc Nephrology.* v. 17, n. 1, p. 131-40, 2006;

ROMANIN, D.; SERRADELL, M.; MACIEL, D. G.; LAUSADA, N.; GARROTE, G.L.; RUMBO, M. **Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir.** v. 140, n. 2–3, p. 102–108, 2010;

SCHMIEDT, C. W.; NELSON, S. A.; BRAINARD, B. M.; BROWN, C. A.; VANDENPLAS, M.; HURLEY, D. J. **Bilateral renal ischemia as a model of acute kidney injury in cats.** *Res Vet Sci.* V. 93, p. 950-959, 2012;

SENOL, A.; ISLER, M.; SUTCU, R.; AKIN, M.; CAKIR, E.; CEYHAN, B. M.; KOCKAR, M. C. **Kefir treatment ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats.** V. 21, p. 13020-13029, 2015;

SHAWKAT, H.; WESTWOOD, M.; MORTIMER, A. **Mannitol: a review of its clinical uses.** *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain.* v. 2, p. 82-85, 2012;

SHIRIER, R.W.; WABG, W.; POOLE, B.; MITRA A. **Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy.** *Journal Clinic Investigative,* v. 114, n. 1, p. 5-14, 2004;

SINGH, A. P.; JUNEMANN, A.; MUTHURAMAN, A.; JAGGI, A. S.; SINGH, N.; GROVER, K.; DHAWAN, R. **Animal models of acute renal failure.** *Pharmacology Rep.* v. 64, n. 1, p.31-44, 2012;

SMITH, H.W.; FINKELSTEIN, N.; ALIMINOSA, L.; CRAWFORD B.; GRABER, M. **The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man.** *Journal Clinical Investigation,* v.24, p.388-404, 1945;

STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P. **The fundamental basis of inflammatory bowel disease.** *Journal of Clinical Investigation.* v. 117, n. 3, p. 514-521, 2007;

TERUYA, K., YAMASHITA, M., TOMINAGA, R., NAGIRA, T., SHIM, S.-Y., KATAKURA, Y., TOKUMARU, S., TOKUMARU, K., BARNES, D., SANETAKA, S. **Fermented milk, Kefir-Kefir enhances glucose uptake into insulin-responsive muscle cells.** *Cytotechnology,* 40(1-3):107-16, 2002;

TONINI, C. L.; CAMPAGNARO, B. P.; LOURO, L. P. S.; PEREIRA, T. M. C.; VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S. **Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E- deficient mice.** International Journal of Molecular Sciences, v. 14, n. 2, p. 3325-3342, 2013;

UCHINO, S.; KELLUM, J. A.; BELLOMO, R.; DOIG, G. S.; MORIMATSU, H.; MORGERA, S.; SCHETZ, M.; TAN, I.; BOUMAN, C.; MACEDO, E.; GIBNEY, N.; TOLWANI, A.; RONCO, C. **Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study.** Journal of the American Medical Association. v. 294, n. 7, p. 813-8, 2005;

WANG, L.; ZHONG, H.; LIU, K.; GUO, A.; QI, X, CAI, M. **The evaluation of kefir pure culture starter: Liquid-core capsule entrapping microorganisms isolated from kefir grains.** 2016;

WEI, Q.; DONG, G.; CHEN, J. K.; RAMESH, G.; DONG, Z. **Bax and Bak have critical roles in ischemic acute kidney injury in global and proximal tubule-specific knockout mouse models.** Kidney International. v. 84, n. 1, p. 138-48, 2013;

WILLIAMS, P.; LOPEZ, H.; BRITT, D.; CHAN, C.; EZRIN, A.; HOTTENDORF, R. **Characterization of renal ischemia-reperfusion injury in rats.** Journal Pharmacology Toxicology Methods. v. 37, p. 1-7, 1997;

WU, N. C., TONG, S. P., YANG, C. Y., WANG, C. J., WANG, J. J. **MK-571 Attenuates Kidney Ischemia and Reperfusion-Induced Airway Hypersensitivity in rats.** Transplantation Proceedings, v. 46, n.4, p. 1127-1130, 2014;

YACOUB, R.; KAJI, D.; PATEL, S. N.; SIMOES, P. K.; BUSAYAVALLASA, D.; NADKARNI, G. N.; ELE, J. C.; COCA, S. G.; URIBARRI, J. **Association between probiotic and yogurt consumption and kidney disease: insights from NHANES.** Nutr Journal. v. 15, n. 10, 2016;

YAMAMOTO, K.; WILSON, D. R.; BAUMAL, R. **Outer medullary circulatory defect in ischemic acute renal failure.** Am J Pathol. V. 116, p. 253-261, 1984;

YENER, A.U.; SEHITOGLU, M. H.; OZKAN, M. T. A.; BEKLER, A.; EKIN, A.; COKKALENDER, O.; DENIZ, M.; SACAR, M.; KARACA, T.; OZCAN, S.; KURT, T. **Effects of kefir on ischemia-reperfusion injury.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences. v. 19, p. 887-896, 2015;

ZHU, Y.; BLUM, M.; HOFF, U.; WESSER, T.; FECHNER, M.; WESTPHAL, C.; GÜRGEN, D.; CATAR, R. A.; PHILIPPE, A.; WU, K.; BUBALO, G.; ROTHE, M.; WELDON, S. M.; DRAGUN, D.; SCHUNCK, W. H. **Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Soluble Epoxide Hydrolase-Deficient Mice.** e. PLoS ONE. v. 11, n. 1, 2016;

ZUBILLAGA, M., WEILL, R., POSTAIRE, E., GOLDMAN, C., CARO, R., BOCCIO, J.
Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases.
Nutrition Research, v. 21; p. 569–579, 2001.