

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEFROPROTETOR PELO PROBIÓTICO  
KEFIR EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À NEFROPATIA POR  
CONTRASTE**

**STEPHANY DE CASTRO WANDERKOKE**

**VILA VELHA-ES**  
**OUTUBRO / 2021**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEFROPROTETOR PELO PROBIÓTICO  
KEFIR EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À NEFROPATIA POR  
CONTRASTE**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**STHEPHANY DE CASTRO WANDERKOKE**

**VILA VELHA-ES**  
**OUTUBRO / 2021**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

W245a

Wanderkoke, Sthephany de Castro.

Avaliação do efeito nefroprotetor pelo probiótico kefir em camundongos submetidos à nefropatia por contraste / Shephany de Castro Wanderkoke . – 2021.

44 f. : il.

Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2021.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Rins – Doença. 3. Kefir.  
4. Stress oxidativo. I. Pereira, Thiago de Melo Costa.  
II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

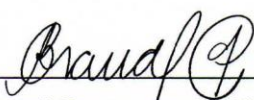
# STEPHANY DE CASTRO WANDERKOKE

## AVALIAÇÃO DO EFEITO NEFROPROTETOR PELO PROBIÓTICO KEFIR EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À NEFROPATIA POR CONTRASTE

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

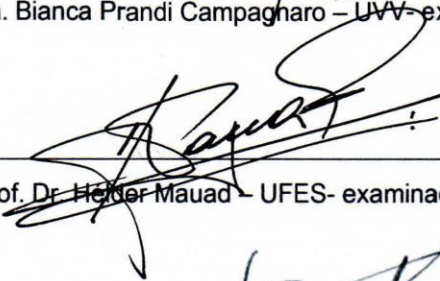
Aprovada em 29 de outubro de 2021.

### Banca examinadora:



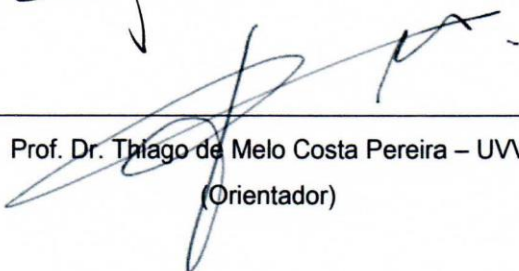
---

Prof. Dra. Bianca Prandi Campagnaro – UVV- examinador interno



---

Prof. Dr. Hélder Mauad – UFES- examinador externo



---

Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira – UVV  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre me guiando e mostrando o melhor caminho;

Aos meus pais por todo o apoio e suporte durante toda a minha vida acadêmica, sem vocês isso nunca seria possível;

Às minhas irmãs por terem suportado até os dias mais estressantes e por terem sido minhas companhias nesse momento final;

À todos os membros da minha família que torceram e acreditaram que esse momento chegaria;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Thiago por ter me recebido muito bem e ter acreditado em mim, me guiado e me formado. Sempre me orgulharei e é uma honra ser sua aluna;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro, por também estar presente nesse meu crescimento profissional, sempre com sua calma e doçura de sempre;

Aos professores Silvana Santos Meyrelles e Breno Valentim Nogueira (UFES) por terem cedido seus laboratórios e alunos para ajudar na finalização desse projeto;

Ao Prof<sup>o</sup>, Dr<sup>o</sup>. Helder Mauad e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Girlândia Brasil por aceitarem a acrescentar na finalização dessa etapa;

À Helena e Karla por terem me ajudado tanto, colocando a mão na massa nas tarefas mais difíceis e dividindo os momentos mais estressantes regados a boas risadas, deixando tudo mais leve;

À Larissa, Glauci, Rafa, Lays, Eduarda e Fernanda por terem me ensinado tanto durante esse tempo, sempre dispostas a ajudar no que era preciso;

A todos os alunos do laboratório 33 e de outros laboratórios vizinhos, acrescentando de todas as maneiras no meu dia a dia;

À Eduarda e Edgar, doutorando da UFES e Tadeu e Flávio, técnicos do LUCCAR por todo o suporte necessário;

Ao meu namorado, André, por sempre acreditar em mim e entender os momentos em que não pude estar presente;

Às agências de fomentos FAPES e CNPq;

À UVV e todos os professores e funcionários que fizeram com que esse sonho tenha se realizado;

À todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram com meu crescimento profissional e pessoal durante esse período. Sem esse conjunto todo, não seria a mesma experiência. **Muito obrigada!**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
2.1. Objetivo geral .....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
3.1. Grupo e desenho experimental .....	15
3.2. Preparação e administração do kefir .....	15
3.3. Indução da nefropatia.....	15
3.4. Análise bioquímica .....	16
3.5. Avaliação do dano ao DNA através do ensaio cometa alcalino.....	16
3.6. Preparação do homogenato renal para realização da AOPP e TBARS .....	17
3.7. Avaliação do estresse oxidativo através dos Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPP) .....	18
3.8. Determinação da peroxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	19
3.9. Análise histológica através da microscopia eletrônica de varredura .....	19
3.10. Análise estatística.....	20
<b>4. RESULTADOS</b> .....	22
4.1. Tanto a monoterapia com o kefir quanto a associação de N-acetilcisteína com kefir atenuam a nefropatia induzida por contraste (NIC) .....	22
4.2. NIC aumenta a peroxidação lipídica tanto em tecido renal quanto sistemicamente e os tratamentos com kefir (monoterapia) e associação de N-acetilcisteína com kefir são benéficos especialmente a nível sistêmico .....	23
4.3. NIC aumenta a oxidação de proteínas plasmáticas e o tratamento convencional não é capaz de proteger contra os efeitos da lesão renal	

.....	25
4.4. A nefropatia induzida por contraste causa danos ao DNA dos camundongos e todos os tratamentos avaliados possuem efeito protetor (especialmente NAC) .....	26
4.5. Aspectos morfológicos pela microscopia eletrônica de varredura: quais os benefícios teciduais do kefir contra a NIC?.....	27
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	33
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	34

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Anatomia do intestino e sua interação com diversos sistemas do organismo. Observa-se a barreira epitelial separando a mucosa da submucosa. A mucosa intestinal pode ser influenciada por diversos fatores como dieta e toxinas. A barreira epitelial é mantida pelas tight junctions, impedindo a passagens de patógenos e citocinas. As células imunes monitoram e mantêm a homeostase intestinal. Vários plexos nervosos percebem mudanças químicas e mecânicas do intestino e comunicam com o sistema nervoso central. Metabólitos, citocinas, células imunes e hormônios derivados desse complexo impactam outros órgãos como rins, sistema cardiovascular e cérebro por meio da circulação (Yang et al., 2018). 02
- Figura 2.** Etapa de análise do cometa alcalino através do programa CASP com um cometa selecionado. Foto da própria autora 07
- Figura 3.** Preparo do homogenato de rins pelo aparelho FastPrep-24 5G, MP Biomedicals. 08
- Figura 4.** Etapas da preparação da amostra para realização da microscopia eletrônica de varredura. A) Pedacos de rins após sofrer criofatura com nitrogênio líquido, B) Pedacos de rins já posicionados para serem revestidos de ouro. Fotos da própria autora. 20
- Figura 5.** Quantificação da ureia plasmática nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-8$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON e # $p < 0,05$  vs. NAC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey). 22
- Figura 6.** Quantificação da creatinina plasmática nos grupos experimentais, com aumento no grupo NIC e diminuição no grupo N+K. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-9$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON, # $p < 0,05$  vs. NAC e & $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey). 23
- Figura 7.** Quantificação da peroxidação lipídica no plasma nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-8$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON e & $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey). 24
- Figura 8.** Quantificação da peroxidação lipídica e tecido renal nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 4-9$  animais por 24



grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

- Figura 9.** Quantificação da oxidação proteica no plasma nos grupos experimentais, observando um aumento nos grupos NIC e NAC. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-11$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey). 25
- Figura 10.** Quantificação da oxidação proteica renal nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-9$  animais por grupo. (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey). 26
- Figura 11.** NAC previne danos ao DNA em modelo experimental da NIC. A) cometas típicos mostrando maior fragmentação de DNA no grupo NIC em comparação com CON, e grupo NAC com redução em comparação com o grupo NIC. B) Média das porcentagens de dano ao DNA através da quantificação de DNA na cauda, observando o aumento em NIC e a proteção em NAC. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 3-6$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON e \* $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey). 27
- Figura 12.** Fotografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV), de tecidos renais dos grupos estudados, confirmando o mecanismo nefroprotetor. Na primeira coluna (A-E), pode-se observar que no grupo NIC houve perda da estrutura glomerular (B) com a preservação das estruturas glomerulares nos grupos NAC (C), KEF (D) e N+K (E), similar ao grupo controle (A). A segunda coluna (F-J) demonstra podócitos irregulares no grupo NIC (G), porém estruturas normais nos grupos NAC (H), KEF (I) e N+K (J), observando podócitos típicos. Já na terceira coluna (K-O) observa-se a representação dos túbulos proximais, com vacuolização no grupo NIC (L). No grupo NAC há uma diminuição dos vacúolos (M) e nos KEF (N) e N+K (M) as estruturas possuem características semelhantes ao grupo controle (K). 29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AOPP	Produtos proteicos de oxidação avançada
CEUA UVV	Comitê de ética no uso de animais da Universidade Vila Velha
CON	Grupo controle tratado com veículo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença renal crônica
EDTA	Ácido etileno diamina tetra acético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FSR	Fluxo sanguíneo renal
HCl	Ácido clorídrico
i.p.	Via intraperitoneal
IRA	Insuficiência renal aguda
IRA-IC	Insuficiência renal aguda induzida por contraste
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
KEF	Grupo tratado com kefir
KI	Iodeto de potássio
LMA	<i>Low Melting Point Agarose</i>
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
MDA	Malondialdeído
N+K	Grupo tratado com associação de N-acetilcisteína e kefir
NAC	N-acetilcisteína
NAC	Grupo tratado com N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NIC	Nefropatia induzida por contraste
NIC	Grupo controle positivo tratado com veículo
NIH	National Institutes of Health
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução salina tamponada

RVR	Resistência vascular renal
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TFG	Taxa de filtração glomerular
UFC	Unidades formadoras de colônias

## RESUMO

WANDERKOKE, STHEPHANY DE CASTRO, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, outubro de 2021. **Avaliação do efeito nefroprotetor pelo probiótico kefir em camundongos submetidos à nefropatia por contraste.** Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

A nefropatia induzida por contraste (NIC) é uma doença iatrogênica deflagrada após a exposição ao contraste iodado, medicamento utilizado em diagnósticos por imagem principalmente em pacientes com doenças cardiovasculares, renais e/ou diabéticos. Entre os possíveis mecanismos envolvidos na patogenia da NIC está a vasoconstrição intrarrenal acompanhada do aumento da biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio (EROs), culminando com o estresse oxidativo. Até o momento, não há opções terapêuticas que evitem de forma satisfatória esse tipo de lesão. Para tanto, diversas investigações envolvendo produtos antioxidantes parecem ser promissoras. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito nefroprotetor do kefir, uma bebida produzida através da fermentação do leite, que tem sido alvo de estudos em nosso laboratório e apresentado importantes efeitos vasodilatadores, anti-inflamatórios e antioxidante. Para isso, camundongos suíços machos adultos foram separados em 5 grupos e pré-tratados por via oral com kefir (0,3 mL/100g), N-acetilcisteína (200 mg/kg) por via intraperitoneal, ambos (NAC+KEF) ou veículo (NIC e controle) durante 5 dias antes da indução da NIC. As dosagens de creatinina e ureia plasmáticas foram utilizadas para avaliar a função renal dos animais. Os danos oxidativos foram analisados através da determinação da oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, tanto no sangue quanto no rim, e o dano ao DNA no sangue através ensaio cometa alcalino. Além disso, foram realizadas análises histológicas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados demonstraram que o kefir em associação com a N-acetilcisteína foi capaz de preservar a função renal, com redução de ureia em 53,86% e creatinina 38,25% ( $p < 0,05$ ), e diminuiu o dano oxidativo sistêmico, via TBARS em 68,04% ( $p < 0,05$ ). O tratamento com kefir também foi benéfico para a proteção da morfologia renal, tanto glomerular quanto tubular, como observado na MEV. Com isso, pode-se afirmar que o kefir é uma substância promissora na prevenção da NIC.

**Palavras chaves:** Lesão renal aguda. Toxicidade renal. Estresse oxidativo. Probiótico. Prebiótico. Antioxidantes. TBARS. AOPP. Cometa alcalino.

## ABSTRACT

WANDERKOKE, STHEPHANY DE CASTRO, M.Sc, University of Vila Velha – ES, october 2021. **Evaluation of the nephroprotective effect of probiotic kefir against radiocontrast-induced contrast nephropathy in mice.** Advisor: Thiago de Melo Costa Pereira.

Contrast-induced nephropathy (CIN) is an iatrogenic disease triggered after exposure to iodinated contrast, a drug used in imaging diagnosis mainly in patients with cardiovascular, renal and/or diabetic diseases. Among the possible mechanisms involved in the pathogenesis of CIN is intrarenal vasoconstriction accompanied by increased bioavailability of reactive oxygen species (ROS), culminating in oxidative stress. So far, there are no therapeutic options that satisfactorily prevent this type of injury. Therefore, several investigations involving antioxidant products seem to be promising. This study aimed to evaluate the nephroprotective effect of kefir, a drink produced through the fermentation of milk, which has been the subject of studies in our laboratory and has shown important vasodilator, anti-inflammatory and antioxidant effects. For this purpose, adult male Swiss mice were separated into 5 groups and pretreated orally with kefir (0.3 mL/100g), N-acetylcysteine (200 mg/kg) intraperitoneally, both (NAC+KEF) or vehicle (CIN and control) for 5 days before CIN induction. The plasma creatinine and urea dosages were used to assess the animals' renal function. Oxidative damage was analyzed by determining protein oxidation and lipid peroxidation, both in blood and kidney, and DNA damage in blood by alkaline comet assay. In addition, histological analysis was performed using scanning electron microscopy. The results showed that kefir in association with N-acetylcysteine was able to preserve renal function, with a reduction in urea by 53.86% and creatinine by 38.25% ( $p < 0.05$ ), and decreased systemic oxidative damage, via TBARS in 68.04% ( $p < 0.05$ ). Kefir treatment was also beneficial for the protection of renal morphology, both glomerular and tubular, as seen in SEM. Thus, it can be stated that kefir is a promising substance in the prevention of CIN.

**Key words:** Acute kidney injury. Renal toxicity. Oxidative stress. Probiotic. Prebiotic. Antioxidants. TBARS. AOPP. alkaline comet

## 1. INTRODUÇÃO

Com o envelhecimento da população e o progresso da medicina, a insuficiência renal aguda (IRA) passou a ser uma doença nosocomial (adquirida após internações hospitalares), sendo a principal causa de problemas renais em pacientes hospitalizados (BASILE *et al.*, 2012). A IRA é uma doença de causas heterogêneas e caracterizada por uma diminuição repentina na taxa de filtração glomerular (TFG) ou oligúria, afetando aproximadamente 20% dos pacientes hospitalizados, sendo que 10% deles necessitam de terapia de substituição renal (LEVEY AND JAMES, 2017). Dentre as muitas causas da IRA, a nefropatia induzida por contraste (NIC) é a terceira causa mais comum observada no meio hospitalar (FARRAR, 2018).

Também conhecida como insuficiência renal aguda induzida por contraste (IRA-IC), a NIC é uma doença iatrogênica, observada após a administração via intravenosa do meio de contraste após procedimentos de diagnóstico ou angiografias, que causa diminuição da função renal, acometendo de 5 a 40% dos pacientes, prolongando a sua hospitalização (ANDREUCCI *et al.*, 2014; FARRAR, 2018; KUSIRISIN *et al.*, 2020). Essa doença é caracterizada pela diminuição da TFG (de 90 para >60 mL/min) ou aumento da creatinina sérica absoluta de 0,5 mg/dL ou relativa de 25% acima do valor de referência, dentro de 24-72 horas após a exposição ao contraste (DE ALMEIDA *et al.*, 2016; KDIGO, 2012).

O grupo contraste é formado por medicamentos que são utilizados para possibilitar a visualização de órgãos e estruturas em exames de imagens, como radiografias e tomografias computadorizadas. O contraste iodado é comumente utilizado para observação de vasos e órgãos, bem como o trato urinário, possibilitando a diferenciação dos tecidos saudáveis e não-saudáveis (ANDREUCCI *et al.*, 2014).

Visto que o contraste iodado é um fármaco ainda muito utilizado para investigar as complicações de pacientes com doenças cardiovasculares, renais ou diabetes, (DE ALMEIDA *et al.*, 2016), ainda é necessária a busca por estratégias de prevenção mais eficazes. Estima-se que a incidência da NIC em indivíduos saudáveis é de 1-2%, podendo ser reversível em todas as ocasiões. Entretanto, em pacientes com doença de base conforme acima mencionado, 4% deles podem progredir para uma doença renal crônica (DRC), evoluindo ainda mais para uma fase terminal da doença

(KUSIRISIN *et al.*, 2020).

Embora se saiba que a fisiopatologia da NIC seja multifatorial, ainda é pouco esclarecida (ANDREUCCI *et al.*, 2014). Entre os principais mecanismos está o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo diminuir a oferta de um importante vasodilatador denominado óxido nítrico (NO). Além disso, após a administração do contraste iodado, já está descrito um descontrole que prevalece a vasoconstrição, sendo potencializada tanto em cardiopatias quanto em diabéticos, gerando uma vasoconstrição prolongada (RUNDBACK *et al.*, 2011; MCCULLOUGH *et al.*, 2016). Consequentemente, há um aumento da resistência vascular renal (RVR), diminuição do fluxo sanguíneo renal (FSR) e da TFG, causando uma hipóxia medular, fechando-se um ciclo vicioso: mais produção de EROs acompanhado de aumento de vasoconstrição renal, danos às células endoteliais e tubulares (DE ALMEIDA *et al.*, 2016).

As EROs, moléculas derivadas do oxigênio, fazem parte do processo metabólico normal das células, estando presente em todas elas. A geração dessas moléculas é importante porque possibilita a apoptose, o reparo celular e a fagocitose de patógenos, atuando como uma molécula de sinalização essencial (BEDARD AND KRAUSE, 2007). Porém, um desequilíbrio na produção de EROs, como demonstrado na fisiopatologia da NIC, gera um sério problema na homeostase corporal causando danos fisiológicos, chamado de estresse oxidativo (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014).

Como os procedimentos que necessitam o uso do contraste não são emergenciais e os pacientes de alto risco são facilmente identificáveis, a NIC é potencialmente evitável, além da prevenção ser de mais fácil manejo que o tratamento (HOSSAIN *et al.*, 2018; GONSALEZ *et al.*, 2019). Após análise de vários estudos, foi estabelecido uma diretriz do *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) para o uso da N-acetilcisteína (NAC), um precursor da glutatona, como agente de tratamento e prevenção da NIC devido ao seu poder antioxidante em associação com soluções isotônicas endovenosas em pacientes que obtenham risco de desenvolverem nefropatia (KDIGO, 2012). Mesmo que a prevenção com a NAC tenha pontos positivos como baixo custo e poucas reações adversas ao medicamento, não há evidências suficientes de que na prática clínica ela possua plena eficácia em todos os pacientes (KDIGO, 2012; BOA *et al.*, 2015)

Assim, novas estratégias de intervenções para prevenção e tratamento da

NIC precisam ser estudadas a fim de combater os danos que os meios de contraste causam ao rim, principalmente em pacientes com fatores de risco associados como os diabéticos e hipertensos, clássicos “pacientes-alvo” dessa intervenção. Sabendo que a fisiopatologia está relacionada a estresse oxidativo, é oportuna a busca por terapias que impeçam a consolidação da NIC, diminuindo a produção de EROs e, ao mesmo tempo, a vasoconstrição renal. Explorando essa estratégia, estudos prévios de nosso laboratório demonstraram resultados promissores contra a NIC como a espécie vegetal *Viola oleífera* (BOA *et al.*, 2015), o extrato de *Achyrocline satureioides* – Macela (GUSS *et al.*, 2017), o fitoterápico silimarina (SANTOS *et al.*, 2019) e também a substância sildenafil (DE ALMEIDA *et al.*, 2016). Apesar dos benéficos resultados, uma das grandes barreiras é o desenvolvimento de ensaios clínicos justificar a aplicabilidade prática. Diante dos custos envolvidos, muitos desses agentes promissores ficam à espera de incentivos governamentais e/ou privados.

Como alternativa, em paralelo existe uma gama de alimentos funcionais (nutracêuticos) que podem apresentar benefícios para doenças renais e que ainda não foram investigados. Esses alimentos funcionais são estudados por possuírem o papel de não só nutrir, mas também trazer diversos benefícios para a saúde e bem-estar (LOUIS *et al.*, 2016). Dessa forma, a obtenção de resultados experimentais promissores poderia ter reflexos na área clínica com maior celeridade (KONGKHAM *et al.*, 2013; MCCULLOUGH AND AKRAWINTHAWONG, 2013; BUYUKLU *et al.*, 2014).

Neste contexto, um alimento em particular tem chamado muita atenção: o kefir, uma bebida produzida através da fermentação do leite pelos “grãos de kefir” (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011). O conjunto de bactérias produtoras do ácido lático e leveduras vivendo em simbiose nesses grãos, após fermentação, produzem uma matriz polissacarídica e proteica chamada de kefiran. (FRIQUES, A. G. F. *et al.*, 2015). É considerado um alimento simbiótico pois possui ação tanto pró (microrganismos que geram benefícios ao hospedeiro) quanto prebiótica (fibras não digeridas que são fermentadas pelas bactérias probióticas gerando crescimento e manutenção da flora) (FREI *et al.*, 2015).

Os registros do kefir antecedem 200 anos a.C., nas montanhas do Cáucaso, Tibete e da Mongólia, onde a tradição era passá-lo de geração em geração, já que era considerado uma riqueza familiar, e devido à crença popular que dizia ser um



alimento dado pelo profeta Maomé (NIELSEN *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2017). Porém, atualmente é encontrado para venda em todo o mundo (NIELSEN *et al.*, 2014). Seu nome é derivado da palavra turca *Keif* que significa “bem-estar”, “viver bem” ou “sentimento bom” devido aos benefícios promovidos pela bebida (NIELSEN *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2017).

Devido ao grande número de formação de grãos durante anos em diferentes locais do mundo, sob influência de diferentes temperaturas e de bactérias fermentadoras de ácido láctico, é importante salientar que há diferenças nas bactérias encontradas nas mudas de kefir utilizadas em cada região (NIELSEN *ET AL.*, 2014). Uma das principais bactérias responsáveis pela produção do kefiran é a *Lactobacillus kefiranofaciens* (ROSA *et al.*, 2017), presente nas amostras que são utilizadas em nossos estudos, como comprovado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (FRIQUES, A. G. F. *et al.*, 2015). O número de bactérias presentes no leite após fermentado, em média, é de  $10^7$  unidades formadoras de colônia (UFC)/ml e de leveduras  $10^4$  UFC/ml (ROSA *et al.*, 2017).

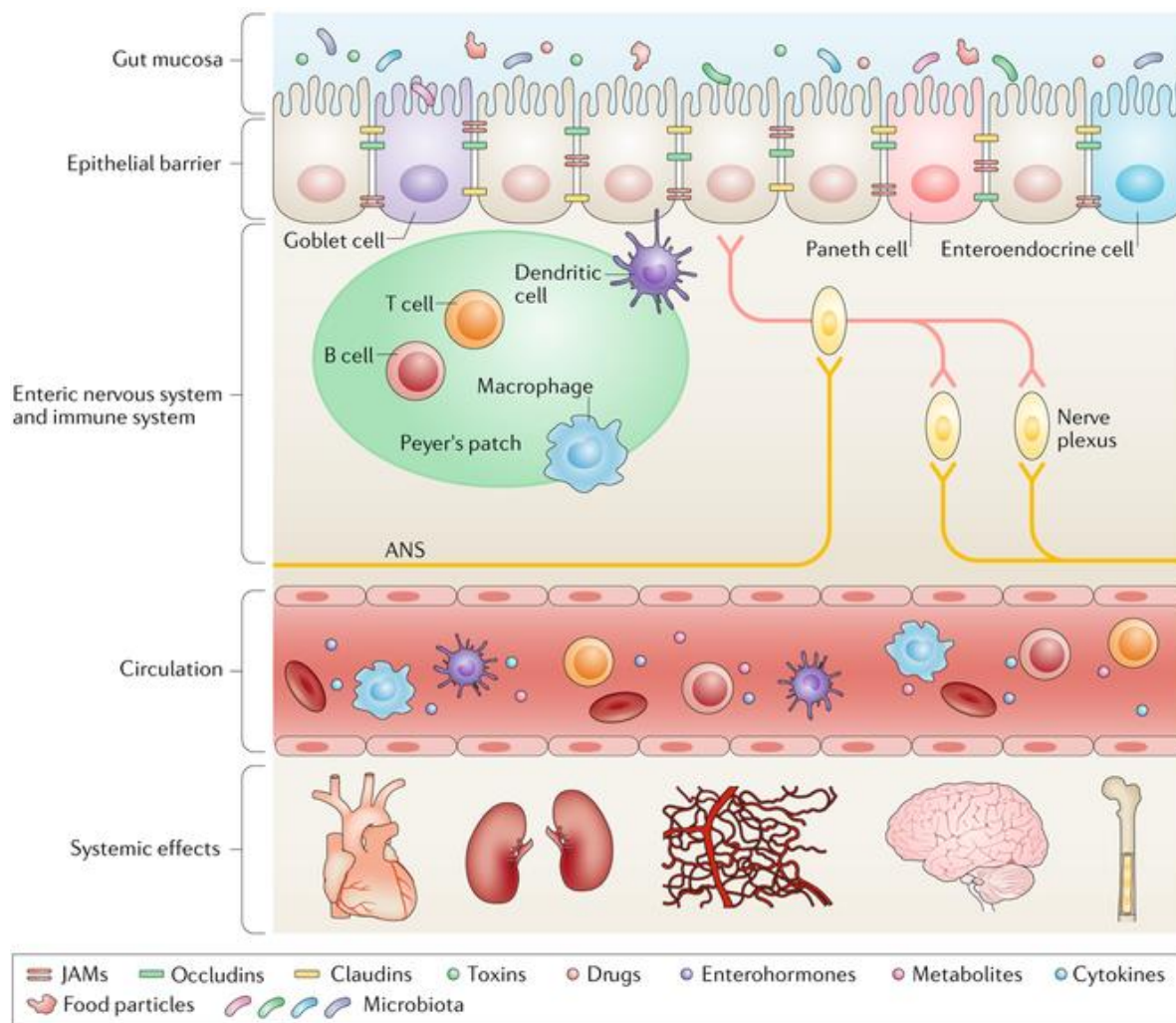
O intestino é um dos primeiros órgãos a interligar fatores ambientais, como a dieta, e a sua interação com diversos sistemas do organismo, como o sistema imunológico e nervoso, impactando substancialmente a resposta fisiológica do hospedeiro (YANG *et al.*, 2018). Para um bom funcionamento desse órgão, é necessário um balanço entre as bactérias benéficas e maléficas que o colonizam, além da permeabilidade intestinal estar normalizada, fazendo com que não haja absorção de substâncias tóxicas ao organismo e bactérias que possam gerar infecções. O estado de disbiose, onde há um desbalanço entre essas bactérias, pode ser causado por diversos fatores como dieta, uso de medicamentos e doenças (KHOURY *et al.*, 2017).

Essa condição pode ser associada com a produção de nefrotoxinas, como o *p*-cresol, e com o aumento da permeabilidade intestinal, resultando na absorção de patógenos e metabólitos tóxicos, contribuindo com a inflamação sistêmica e local da doença renal (KHOURY *et al.*, 2017). A disbiose ainda pode resultar em diversos prejuízos ao organismo, como por exemplo aumento da inflamação e produção de EROs (TOMASELLO *et al.*, 2016; GIL-CARDOSO *et al.*, 2017), fazendo com que seja um risco no agravamento de diversas doenças, inclusive a NIC. Em um estudo realizado por Vaziri e colaboradores (2013), foi possível observar um aumento dos níveis séricos de creatinina e ureia juntamente com diferenças substanciais na

microbiota de animais nefrectomizados, quando comparados com os animais do grupo sham.

Essa relação entre rim e intestino pode ser subdividida em metabolismo-dependente, mediado por metabólitos intestinais que regulam funções fisiológicas do hospedeiro, e via imunológica, onde seus componentes como linfócitos e citocinas possuem importante valor nessa ligação entre os órgãos (EVENEPOEL *et al.*, 2017). Ainda, a comunicação entre as vias metabolismo dependente e imunológica é interligada pelo sistema nervoso central, com a ativação do sistema nervoso simpático, gerando diminuição da filtração renal e da motilidade intestinal (YANG *et al.*, 2018). Todos esses efeitos geram um ciclo vicioso, fazendo com que cada resposta agrave a outra, aumentando cada vez mais a gravidade da doença. Dessa forma, é possível evidenciar a existência do eixo cérebro-intestino-rim, que realiza o processo de comunicação entre esses os órgãos (Figura 1) (MIRANDA *et al.*, 2017).

A ação simbiótica do kefir promove o crescimento e manutenção de uma microbiota intestinal balanceada, fazendo com que a atividade desses microrganismos presentes no trato gastrointestinal seja necessária para a melhora da saúde do hospedeiro através da diminuição da permeabilidade intestinal e restituindo a eubiose (MARKOWIAK AND SLIZEWSKA, 2017). Além disso, o kefir também possui ação anti-inflamatória e antioxidante (NIELSEN *et al.*, 2014; FRIQUES, A. *et al.*, 2015; YENER *et al.*, 2015; KLIPPEL *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2017; SANTANNA *et al.*, 2017), ajudando a restabelecer a homeostase do organismo.



**Figura 1.** Anatomia do intestino e sua interação com diversos sistemas do organismo. Observa-se a barreira epitelial separando a mucosa da submucosa. A mucosa intestinal pode ser influenciada por diversos fatores como dieta e toxinas. A barreira epitelial é mantida pelas *tight junctions*, impedindo a passagem de patógenos e citocinas. As células imunes monitoram e mantêm a homeostase intestinal. Vários plexos nervosos percebem mudanças químicas e mecânicas do intestino e comunicam com o sistema nervoso central. Metabólitos, citocinas, células imunes e hormônios derivados desse complexo impactam outros órgãos como rins, sistema cardiovascular e cérebro por meio da circulação (YANG et al., 2018).

Devido a essas características anti-inflamatórias, antioxidantes e por ser um simbiótico, restaurando e promovendo a manutenção da microbiota intestinal, o kefir já vem sendo estudado como estratégia terapêutica em várias doenças (YENER et al., 2015). Em relação às doenças renais, há estudos apenas em animais diabéticos (PUNARO et al., 2014a; KAHRAMAN et al., 2021) ou dietas ricas em sais (CHEN et al., 2020). Até o momento, nenhum estudo foi realizado observando o efeito do kefir na nefropatia induzida por contraste, justificando assim nossa oportuna investigação.

Portanto, diante de resultados protetores da suplementação com kefir em vários modelos experimentais estresse-oxidativo dependentes (demonstrados tanto

pelo nosso grupo de pesquisa como por outros), somada a escassez de recursos farmacológicos para a prevenção da NIC, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito nefroprotetor do kefir, tanto em monoterapia quanto em associação com a N-acetilcisteína a fim de abrir novos horizontes para minimizar essa complicação evitável na população.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito nefroprotetor do probiótico kefir e sua associação com o tratamento convencional no modelo murino de nefropatia induzida por contraste.

### 2.2. Objetivo específicos

1. Determinar as concentrações séricas de ureia e creatinina do animais;
2. Investigar através de marcadores bioquímicos convencionais e de estresse oxidativo se o kefir e sua associação com o tratamento convencional são capazes de proteger o rim das lesões induzidas por radiocontraste.
3. Investigar através de ensaios histológicos, se o probiótico kefir, bem como sua associação com NAC, é/são capaz(es) de proteger das lesões renais induzidas por radiocontraste;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a pesquisa, foram utilizados camundongos suíços machos, provenientes do biotério da Universidade Vila Velha, de três meses de idade e peso corporal entre 30-45g. Esses foram acomodados em gaiolas com no máximo três animais em cada, com livre demanda de água (*ad libitum*), até o início do tratamento, e comida, respeitando o ciclo claro e escuro. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes de cuidado recomendado pelo *National Institutes of Health (NIH)*. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Vila Velha (CEUA UVV nº 550-2019).

#### 3.1. Grupo e desenho experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: (1) grupo controle (CON); (2) grupo nefropatia induzida por contraste (NIC); (3) grupo N-acetilcisteína (NAC); (4) kefir (KEF) e (5) N-acetilcisteína + kefir (N+K). Durante 5 dias de tratamento, o grupo CON e NIC receberam, por gavagem, leite integral acidificado em pH 5,0 em uma quantidade de 0,3 mL/100g de peso; o grupo NAC foi administrado por via intraperitoneal N-acetilcisteína 200 mg/kg de peso e o grupo KEF recebeu, por gavagem, kefir 4% na dosagem de 0,3 mL/100g de peso. O grupo N+K recebeu tanto N-acetilcisteína quanto kefir na mesma dosagem dos grupos anteriores. Após o período de tratamento, foi induzido a nefropatia.

#### 3.2. Preparação e administração do kefir

Para a preparação do kefir, primeiramente os grãos foram incubados em leite UHT na concentração de 4%, mantidos em temperatura ambiente durante 24 horas e, em seguida, coados. O leite coado foi mantido à 4°C por 24 horas para finalização da fermentação. Após, foram aliquotados a cada 1 mL e congelados na temperatura de -20°C até o momento do tratamento dos animais.

#### 3.3. Indução da nefropatia

A indução da nefropatia foi realizada conforme descrito por Boa e colaboradores (Boa *et al.*, 2015). Após o 5º dia de tratamento, todos os grupos foram privados de água durante 16 horas. Terminadas as 16 horas, foi administrado, por

via intraperitoneal, indometacina, um inibidor da cicloxigenase (10 mg/kg i.p., dissolvido em dimetilsufóxido) diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO – 5 mg/mL), e N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma-Aldrich), um inibidor não seletivo do óxido nítrico sintase, na dosagem de 10 mg/kg (dissolvido em solução salina 5 mg/mL). Após 15 minutos, os animais receberam radiocontraste ioversol (Henetix, 350 mg l/mL), monomérico de baixa osmolaridade 1,5 g de iodo/kg i.p. Os animais do grupo controle receberam salina em substituição dos medicamentos. Após 24 horas os animais foram eutanasiados com tiopental sódico para coleta de sangue, por punção cardíaca no ventrículo direito, e rins.

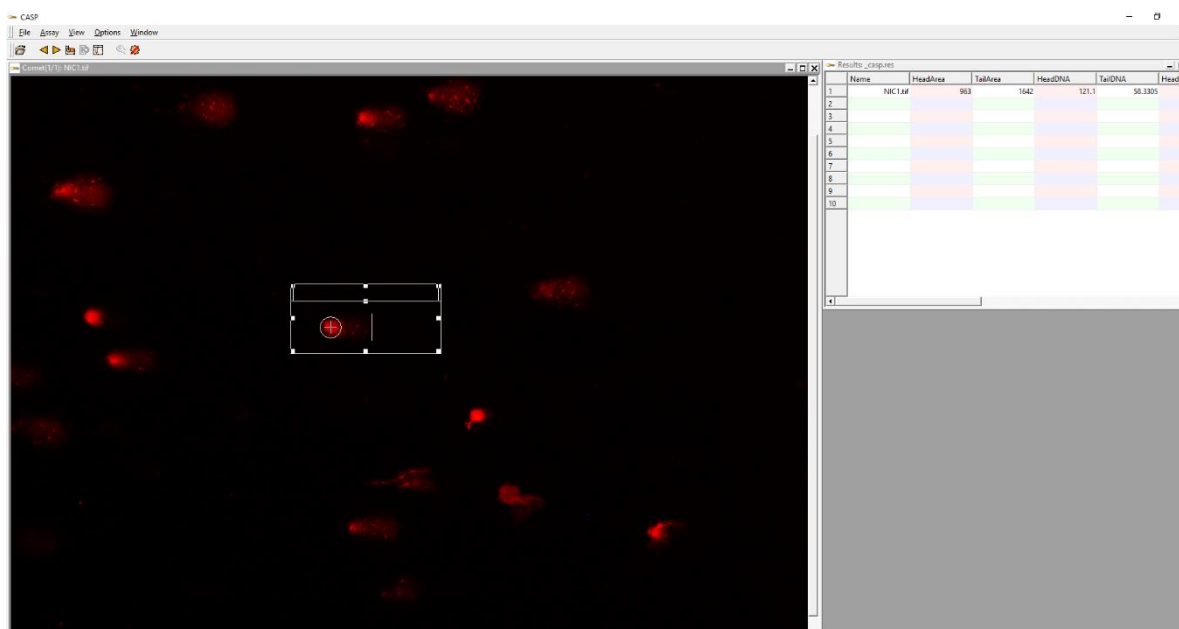
#### 3.4. Análise bioquímica

No momento da eutanásia, o sangue foi coletado por punção cardíaca. Após a coleta, as amostras foram transferidas para um tubo de poliestireno contendo EDTA 0,33 mol/L e homogeneizadas vagarosamente. O plasma foi separado do sangue através de centrifugação durante 10 min a 4.000 G, sendo posteriormente armazenado à -80 °C até análise. Foram avaliados os parâmetros de ureia e creatinina através de kits (GoldAnalisa).

#### 3.5. Avaliação do dano ao DNA através do ensaio cometa alcalino

Para realização do ensaio cometa alcalino, as amostras de sangue frescas foram homogeneizadas com solução agarose 1% (*Low Melting Point Agarose-LMA*), colocadas em lâminas de vidro pré-preparadas com uma camada de agarose, cobertas com uma lamínula e resfriadas à 4°C. Para a lise da membrana celular e nuclear, as lamínulas foram retiradas e as lâminas passaram por uma solução de lise a 4°C (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO. pH – 10) durante 1 hora e em seguida lavadas com água destilada e PBS gelados. Para o desenovelamento do DNA, as lâminas lavadas foram colocadas em cuba de eletroforese e recobertas com solução de eletroforese a 4°C (300mM NaOH e 1mM EDTA – pH 13) por 40 minutos. A eletroforese foi realizada à 4°C por 20 minutos, a 300 mA e 32 V. Em seguida, as lâminas foram retiradas da cuba e cobertas com solução de neutralização a 4°C (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5), lavadas em três ciclos de 5 minutos cada, fixadas com metanol PA gelado durante 2 minutos e deixadas secar

por 12 horas. Para análise, as lâminas foram coradas com 30  $\mu$ L de brometo de etídio (20 $\mu$ g/mL), cobertas com lamínulas, e fotografadas em microscopia de fluorescência do laboratório de Fisiologia Translacional, do Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal do Espírito Santo e analisadas pelo programa CASP 98, domínio público, utilizando a porcentagem de DNA na cauda para análise do dano ao DNA (Figura 2). Protocolo adaptado de Campagnaro *et.al.* (2013).



**Figura 2.** Etapa de análise do cometa alcalino através do programa CASP com um cometa selecionado. Foto da própria autora

### 3.6. Preparação do homogenato renal

Após a eutanásia e perfusão com PBS, os rins foram pesados e colocados em tubos com 10x o seu peso de PBS. Para serem homogeneizados, os rins foram colocados em tubos específicos para a lise de células que contêm uma conta de cerâmica, que é agitada a 4 m/segundo durante 30 segundos (FastPrep-24 5G, MP Biomedicals) (Figura 3), a fim de romper a membrana das células e expondo todo o conteúdo intracelular para a realização dos experimentos. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 7 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e armazenado em -80°C até o momento da análise.





**Figura 3.** Preparo do homogenato de rins pelo aparelho FastPrep-24 5G, MP Biomedicals.

### 3.7. Avaliação do estresse oxidativo através dos Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPP)

Os produtos proteicos de oxidação avançada são gerados por meio da ação do estresse oxidativo e formados pela interação de oxidantes clorados, principalmente ácido hipocloroso e cloraminas com o plasma, e carregados pela albumina nos seres vivos (Witkosarsat *et al.*, 1996), sendo um ótimo biomarcador para estresse oxidativo. Foi realizado conforme descrito por (Hanasand *et al.*, 2012) no plasma e no tecido renal. Para a determinação dos níveis AOPP foi necessária a diluição do plasma 1:1 e dos rins em 1:10 em PBS. Foram adicionadas em uma placa de 96 poços de fundo chato 40  $\mu\text{L}$  das amostras, 160 $\mu\text{L}$  de ácido cítrico anidro 0,20M e 10  $\mu\text{L}$  de iodeto de potássio (KI) 1,16M. Em seguida, agitou-se a placa manualmente durante 2 minutos e a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 340nm, em um leitor de microplacas (Spectra-Mas-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), contra o branco contendo 200  $\mu\text{L}$  de ácido cítrico anidro 0,20M e 10  $\mu\text{L}$  de KI. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão realizada com equivalentes de cloramina T. Os resultados foram

expressos em  $\mu\text{M}$  de cloramina T/mg proteína. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### 3.8. Determinação da peroxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

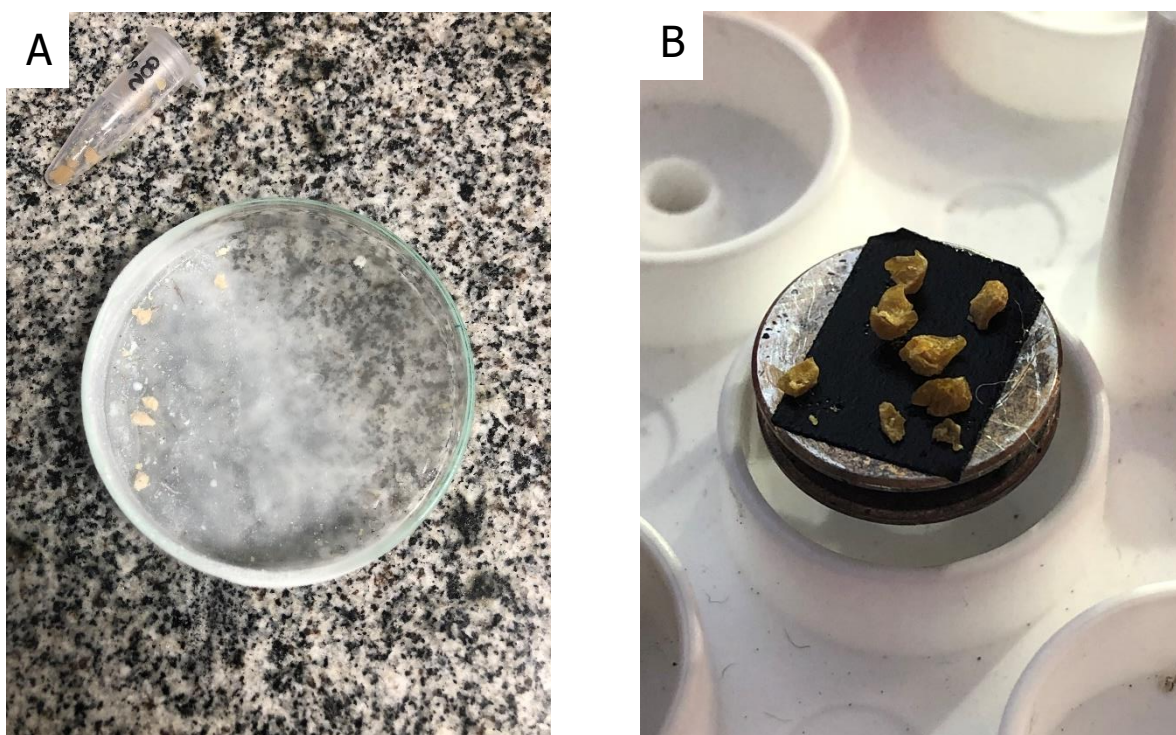
A peroxidação lipídica no plasma e nos rins foi mensurada através da reação de seus produtos com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Para isso, 43  $\mu\text{L}$  de amostra, tanto plasma quanto homogenato renal, reagiu com 77  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 7% em um tubo de poliestireno e centrifugada por 10 minutos à 7.400 rpm (MiniSpin 5452 - Eppendorf). Após os 10 minutos, 47  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi passado para outro tubo de poliestireno e adicionado 53  $\mu\text{L}$  de TBA 0,06% e em seguida homogeneizado com um vórtex. Os tubos ficaram em banho-maria por 1 hora à 95°C e depois pipetados em uma placa de 96 poços e a leitura realizada em leitor de ELISA (Spectra-Mas-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) à 532 nm. A quantificação da peroxidação lipídica foi calculada com base em uma curva padrão realizada com o malondialdeído (MDA), principal produto formado pela quebra de ácidos graxos polinsaturados e normalizada com a quantificação de proteínas totais realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976; PATOCKOVA *et al.*, 2003; MOSELHY *et al.*, 2013; SPIRLANDELI *et al.*, 2014).

### 3.9. Análise histológica através da microscopia eletrônica de varredura

A preparação para a análise histológica do rim foi realizada conforme descrito por (BOA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2019). Após a perfusão com PBS realizada no momento da eutanásia, os rins foram retirados, seccionados longitudinalmente com lâmina de barbear, fixados em Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1M) e refrigerados até análise.

Para a análise, as amostras foram lavadas três vezes com tampão cacodilato (0,1 M; pH 7,2) por 30 minutos cada. Após as lavagens, foi adicionado um crioprotetor (glicerol 30% em tampão cacodilato 0,1M) gota a gota a cada 5 min, até fazer com que o volume dobre, ou seja, que a concentração final do crioprotetor chegue a 15%, deixando por 30 minutos. A seguir, retirou-se toda a solução e adicionou-se o crioprotetor na concentração de 30%. Após 3 horas, todo o

crioprotetor foi retirado e as amostras foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após congelamento total, as amostras foram mergulhadas em nitrogênio líquido afim de deixá-la totalmente rígida. Com uma pinça previamente resfriada, os rins sofreram um golpe leve para que sejam fraturados, sem a comprometer a estrutura do órgão (Figura 4A). Em seguida, foram desidratados em gradiente ascendente de etanol (30%, 50%, 70%, 90%) por 10 minutos cada e em 100%, 3 vezes por 10 min cada. Foi realizada a secagem das amostras por ponto crítico em  $\text{CO}_2$ , para que todo o álcool seja removido e revestidas com 10 nm de ouro puro em um dispositivo de revestimento por aspersão sob vácuo (Desk V, Denton Vacuum) e estudados utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV) de modo direto.



**Figura 4.** Etapas da preparação da amostra para realização da microscopia eletrônica de varredura. A) Pedacos de rins após sofrer criofratura com nitrogênio líquido, B) Pedacos de rins já posicionados para serem revestidos de ouro. Fotos da própria autora.

### 3.10. Análise estatística

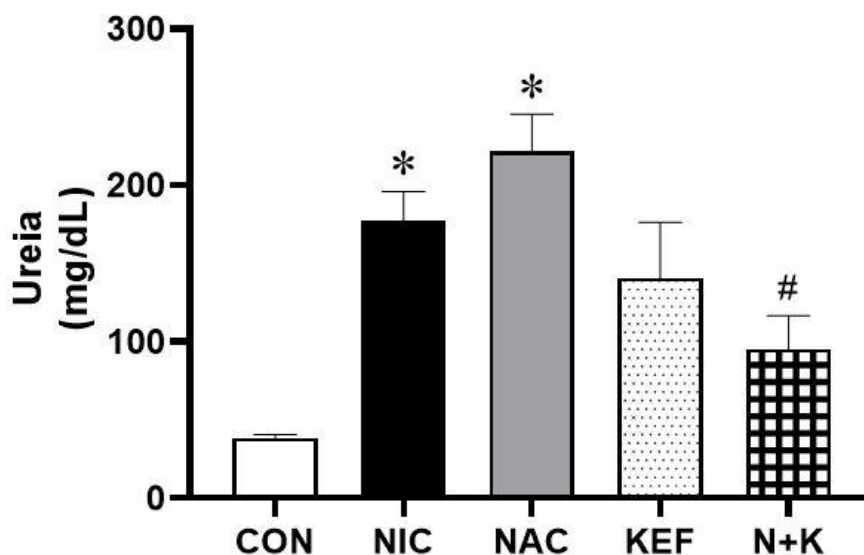
Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) uma via, seguido do teste post hoc de Tukey, usando o software Prisma (Prism 6.0, GraphPad

Software, Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Tanto a monoterapia com o kefir quanto a associação de N-acetilcisteína com kefir atenuam a nefropatia induzida por contraste (NIC)

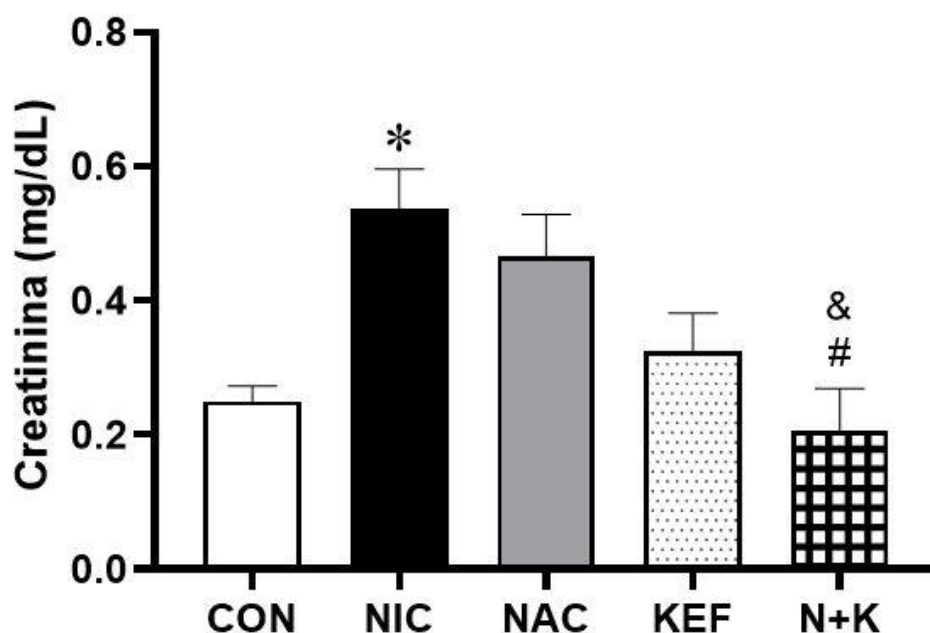
Como esperado, foi observado que o grupo de camundongos NIC apresentou aumento dos valores da ureia sérica (Figura 5) quando comparado ao grupo controle (~4.5 x,  $p < 0.05$ ). Entretanto, o grupo com o tratamento padrão não apresentou redução na uremia (NAC  $222 \pm 23$  vs. NIC  $177 \pm 18$  e CON  $38 \pm 2$  mg/dL),  $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle. Entretanto, o fato mais interessante é que tanto o kefir como monodroga quanto a associação da N-acetilcisteína com o kefir promoveram a proteção dos rins contra a nefropatia induzida por contraste, diminuindo os valores da ureia sérica em comparação com os grupos NAC (KEF  $141 \pm 35$  mg/dL; N+K  $95 \pm 21$  mg/dL,  $p < 0,05$ ).



**Figura 5.** Quantificação da ureia plasmática nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-8$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON e # $p < 0,05$  vs. NAC (ANOVA uma via, seguida de *post-hoc* de Tukey).

Avaliando os valores séricos de creatinina (Figura 6), outro biomarcador clássico da nefropatia induzida por contraste, foi possível observar um aumento dessa taxa no grupo NIC ( $0,53 \pm 0,05$  vs. CON  $0,25 \pm 0,02$  mg/dl,  $p < 0,05$ ). Da mesma

forma, a associação N+K apresentou diminuição deste biomarcador ( $0,20 \pm 0,06$ mg/dL,  $p < 0,05$ ).

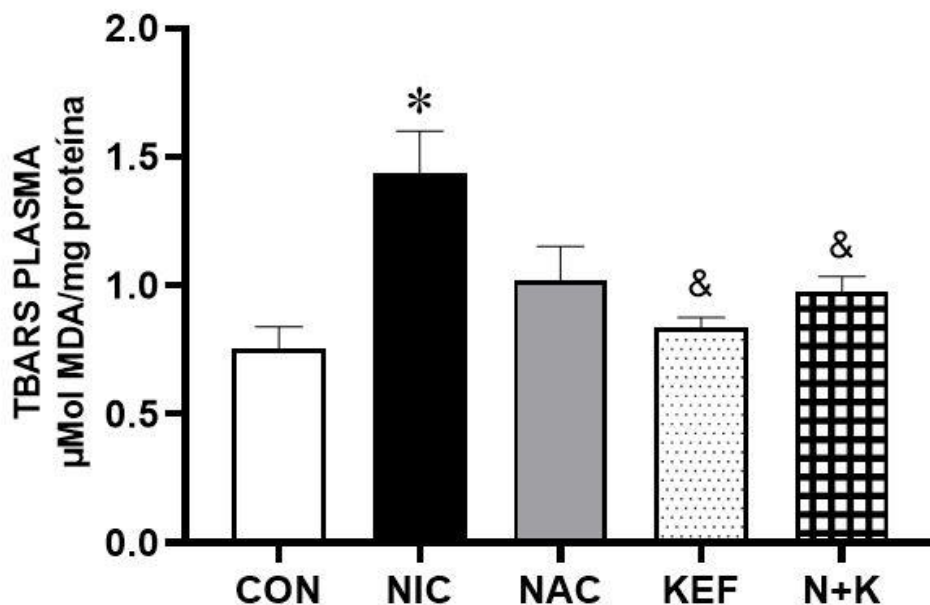


**Figura 6.** Quantificação da creatinina plasmática nos grupos experimentais, com aumento no grupo NIC e diminuição no grupo N+K. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-9$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON, # $p < 0,05$  vs. NAC e & $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de *post-hoc* de Tukey).

#### 4.2. NIC aumenta a peroxidação lipídica tanto em tecido renal quanto sistemicamente e os tratamentos com kefir (monoterapia) e associação de N-acetilcisteína com kefir são benéficos especialmente em nível sistêmico

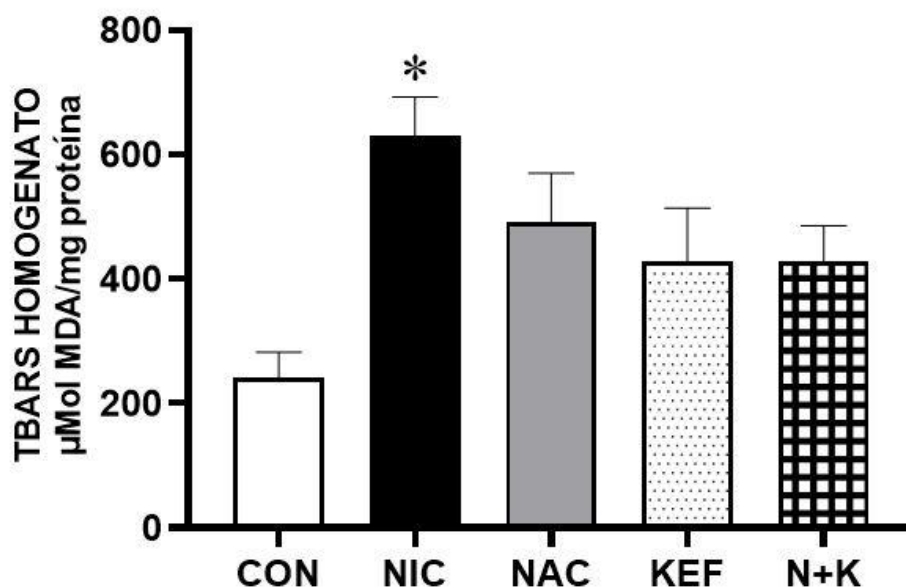
Na quantificação da peroxidação lipídica sérica (Figura 7), pode-se observar aumento no grupo NIC em comparação com o grupo controle (NIC  $1,40 \pm 0,16$  vs. CON  $0,75 \pm 0,08$   $\mu$ Mol MDA/mg proteína,  $p < 0,05$ ). O fato interessante é a observação da redução desse parâmetro nos grupos KEF e N+K ( $0,83 \pm 0,03$  e  $0,97 \pm 0,06$   $\mu$ Mol MDA/mg proteína respectivamente,  $p < 0,05$ ) em comparação com o

grupo NIC, o que não foi observado no grupo NAC ( $1,02 \pm 0,13 \mu\text{Mol MDA/mg}$  proteína).



**Figura 7.** Quantificação da peroxidação lipídica no plasma nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-8$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON e & $p < 0,05$  vs NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

A partir da quantificação do TBARS no tecido renal (Figura 8), pode-se observar que a nefropatia induzida por contraste aumenta a peroxidação de lipídios nos camundongos do grupo NIC ( $630 \pm 62$  vs. CON  $241 \pm 40 \mu\text{Mol MDA/mg}$  proteína,

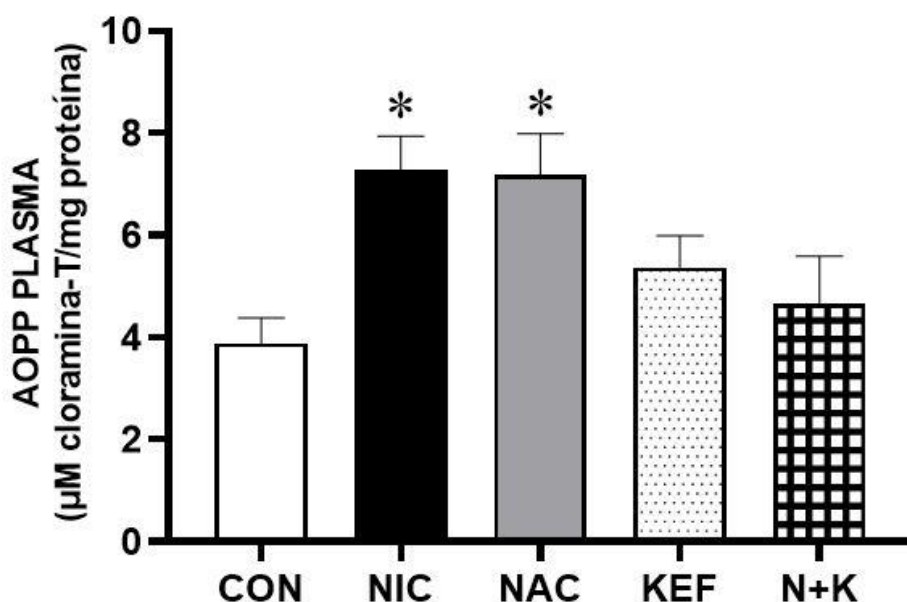


**Figura 8.** Quantificação da peroxidação lipídica e tecido renal nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 4-9$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

$p < 0,05$ ). Entretanto, nem o tratamento com kefir nem com associação com NAC foram diferentes do grupo NIC (NAC  $491 \pm 79$  KEF  $428 \pm 85$  e N+K  $428 \pm 57$   $\mu\text{Mol}$  MDA/mg proteína).

#### 4.3. NIC aumenta a oxidação de proteínas plasmáticas e o tratamento convencional não é capaz de proteger contra os efeitos da lesão renal

A Figura 9 representa a dosagem plasmática dos produtos avançados de oxidação proteica, observando um aumento desses níveis no grupo NIC ( $7,2 \pm 0,7$  vs. CON  $3,8 \pm 0,5$   $\mu\text{M}$  cloramina-T/mg proteína,  $p < 0,05$ ), sendo que o mesmo efeito foi observado nos camundongos do grupo NAC comparado com o grupo controle ( $7,2 \pm 0,8$   $\mu\text{M}$  cloramina-T/mg proteína,  $p < 0,05$ ). É importante destacar que não foi observada diferença entre os grupos KEF e N+K quando comparado ao grupo controle ( $5,4 \pm 0,6$  e  $4,7 \pm 0,9$   $\mu\text{M}$  cloramina-T/mg proteína respectivamente).

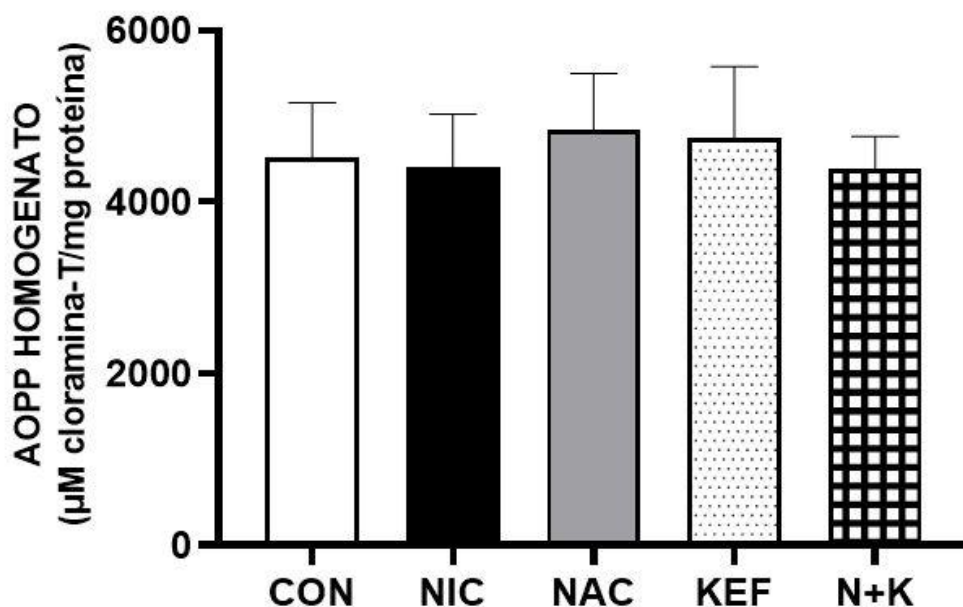


**Figura 9.** Quantificação da oxidação proteica no plasma nos grupos experimentais, observando um aumento nos grupos NIC e NAC. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-11$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

Embora as alterações da AOPP foram bem observadas a nível sérico, os produtos avançados de oxidação proteica nos rins não apresentaram o mesmo perfil (Figura 10). Não foi possível observar diferença estatísticas entre os grupos



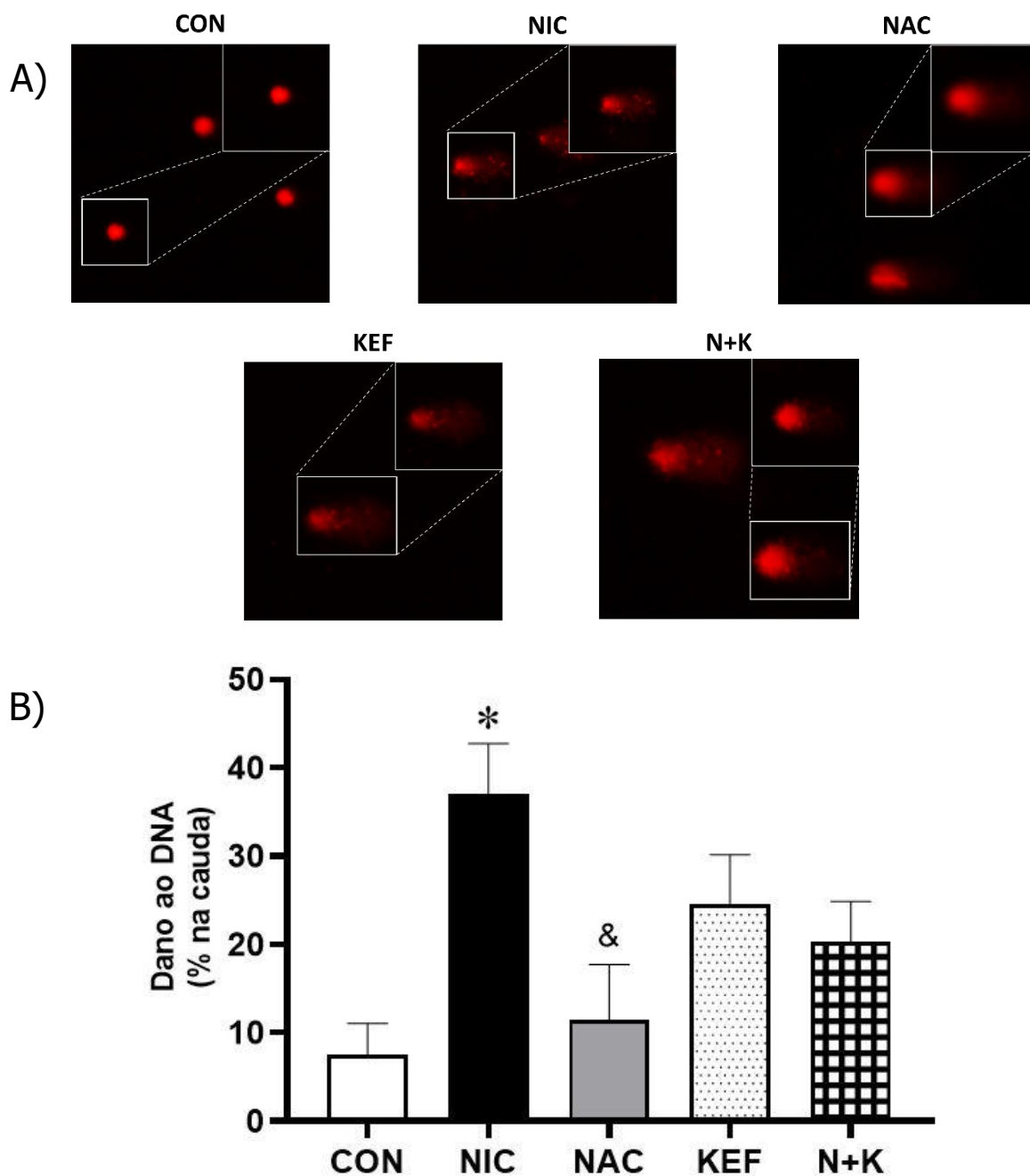
avaliados (CON  $4519 \pm 637$ ; NIC  $4410 \pm 616$ ; NAC  $4837 \pm 662$ ; KEF  $4747 \pm 827$ ; N+K  $4386 \pm 374$   $\mu\text{M}$  cloramina-T/mg proteína).



**Figura 10.** Quantificação da oxidação proteica renal nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-9$  animais por grupo. (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

#### 4.4. A nefropatia induzida por contraste causa danos ao DNA dos camundongos e todos os tratamentos avaliados possuem efeito protetor (especialmente NAC)

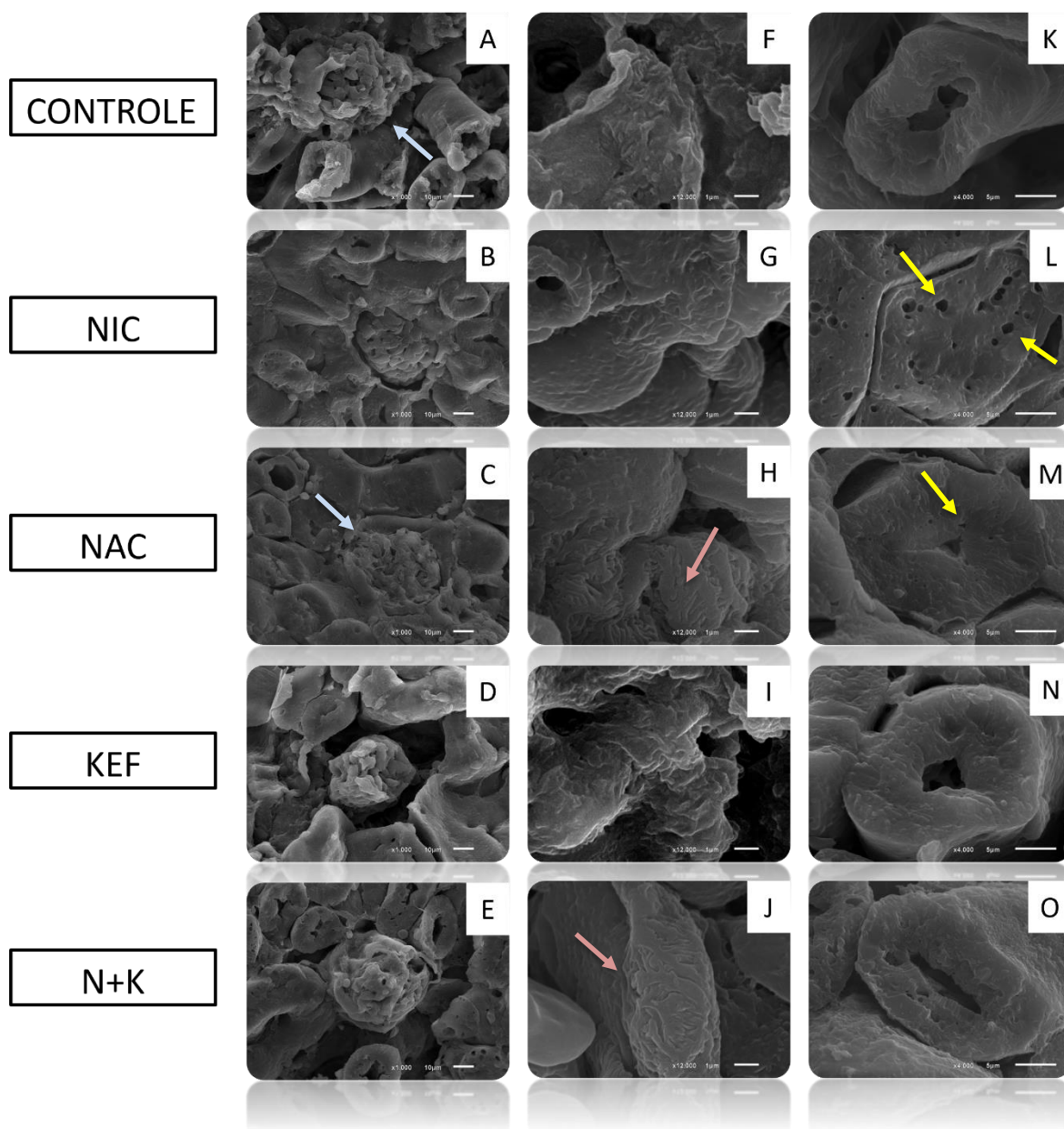
Após a realização do ensaio cometa alcalino, é possível observar através da Figura 11 um aumento dos danos ao DNA ( $\sim 5x$ ,  $p < 0,05$ ) de células sanguíneas no grupo NIC ( $37 \pm 6$  % na cauda) comparado com o grupo controle ( $7 \pm 3$  % na cauda,  $p < 0,05$ ). De forma interessante, o grupo NAC apresentou efeito antígenotóxico ( $12 \pm 6$  % na cauda,  $p < 0,05$ ). Dentre os tratamentos com kefir, nenhum deles apresentou diferença quando comparado ao grupo controle (KEF  $25 \pm 6$  e N+K  $20 \pm 5$  % na cauda).



**Figura 11.** NAC previne danos ao DNA em modelo experimental da NIC. A) cometas típicos mostrando maior fragmentação de DNA no grupo NIC em comparação com CON, e grupo NAC com redução em comparação com o grupo NIC. B) Média das porcentagens de dano ao DNA através da quantificação de DNA na cauda, observando o aumento em NIC e a proteção em NAC. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 3-6$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CON e & $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

#### 4.5. Aspectos morfológicos pela microscopia eletrônica de varredura: quais os benefícios teciduais do kefir contra a NIC?

A Figura 12 representa as fotomicrografias realizadas em amostras de rins dos camundongos dos grupos controle e tratados, confirmando características já observadas em outros estudos realizados com nefropatia induzida por contraste (Boa *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2019). No grupo NIC, foi possível observar perda da coesão estrutural (Figura 12B), dano estrutural nos tecidos superficiais do glomérulo como podócitos atípicos (Figura 12G) e vacuolização epitelial nos túbulos proximais (Figura 12L), quando comparado ao grupo controle. Já nos grupos NAC (Figura 12, imagens C, H e M), KEF (Figura 12, imagens D, I e N) e N+K (Figura 12, imagens E, J e O), foi possível observar a prevenção das lesões, com estruturas semelhantes do grupo controle, com preservação estrutural tanto nos glomérulos quanto nos túbulos proximais.



**Figura 12.** Fotografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV), de tecidos renais dos grupos estudados, confirmando o mecanismo nefroprotetor. Na primeira coluna (A-E), pode-se observar que no grupo NIC houve perda da estrutura glomerular (B) com a preservação das estruturas glomerulares nos grupos NAC (C), KEF (D) e N+K (E), similar ao grupo controle (A). A segunda coluna (F-J) demonstra podócitos irregulares no grupo NIC (G), porém estruturas normais nos grupos NAC (H), KEF (I) e N+K (J), observando podócitos típicos. Já na terceira coluna (K-O) observa-se a representação dos túbulos proximais, com vacuolização no grupo NIC (L). No grupo NAC há uma diminuição dos vacúolos (M) e nos KEF (N) e N+K (M) as estruturas possuem características semelhantes ao grupo controle (K).

## 5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários estudos foram realizados observando o efeito benéfico do simbiótico kefir em diversos modelos experimentais estresse oxidativo dependentes (FRIQUES, A. G. F. *et al.*, 2015; KLIPPEL *et al.*, 2016) e em humanos (LEMOS *et al.*; TON *et al.*, 2020). Em relação a modelos de nefropatia, o kefir foi avaliado em animais diabéticos (PUNARO *et al.*, 2014b; KAHRAMAN *et al.*, 2021) ou submetidos à dieta rica em sal (KANBAK *et al.*, 2014). Entretanto, até o momento, havia uma lacuna de investigação relacionada ao kefir e à nefropatia induzida por contraste. Portanto, a relevância desse estudo é demonstrar, pela primeira vez, que o kefir é capaz de proteger os rins e frear o desenvolvimento da NIC, através da preservação da função renal, redução do estresse oxidativo e diminuição das lesões glomerulares e tubulares.

Após a realização do primeiro modelo experimental de nefropatia por contraste em 1980 (GOLMAN AND HOLTAS) em coelhos e ratos, outras variações apareceram durante os anos com diferentes tipos de contrastes e modelos animais. Em 2015, nosso laboratório desenvolveu um modelo de nefropatia em camundongos mais simples e com boa reprodutibilidade (BOA *et al.*). Utilizando a via intraperitoneal, esse modelo experimental se tornou mais fácil de reproduzir quando comparado à maioria dos estudos anteriores que utilizavam a via intravascular, de difícil acesso nesse tipo de animal (AGMON *et al.*, 1994; BILLINGS *et al.*, 2008). No modelo desenvolvido por Boa e colaboradores foi mantido o uso de inibidores da produção de prostaglandinas e NO (dois importantes vasodilatadores renais), como utilizado nos estudos prévios (LEE *et al.*, 2006; BILLINGS *et al.*, 2008; KISS AND HAMAR, 2016; MAMOULAKIS *et al.*, 2017), já que o contraste de forma isolada não causa a lesão renal aguda nos animais, bem como em pacientes sem comorbidades, mimetizando assim o metabolismo de pacientes com pré-disposição à NIC que possuem um comprometimento renal.

Para um melhor diagnóstico da NIC, é necessário a observação de vários fatores, como biomarcadores sistêmicos, locais e parâmetros morfológicos. Com isso, com o intuito de aumentar a confiabilidade do comprometimento renal, o estudo realizou as análises de creatinina e ureia, dois biomarcadores clássicos de nefropatia. Foi possível observar o aumento da azotemia (ureia e creatinina) nos grupos NIC, confirmando a lesão através do modelo experimental escolhido. Além

disso, destaca-se a ineficácia da NAC quanto à função renal, devido ao aumento dos níveis de ureia no grupo NAC, corroborando estudos anteriores que discutiam se a utilização desse medicamento de forma isolada era realmente viável para a prevenção da NIC de forma clínica (SUBRAMANIAM *et al.*, 2016; FAHLING *et al.*, 2017; HOSSAIN *et al.*, 2018; WEISBORD *et al.*, 2018). Dessa forma, nosso laboratório que tradicionalmente desenvolve estudos translacionais, já pode contribuir com esse dado sobre a NAC. Se por um lado esse dado parece ser desanimador para a área clínica, apresentamos em nosso estudo também uma possível solução: como foi possível observar que o grupo que recebeu associação de NAC com kefir obteve redução da azotemia em comparação ao grupo com lesão renal, sugerimos que o kefir possa ser um adjuvante promissor para ser associado à NAC a fim de prevenir a NIC.

Como o estresse oxidativo tem papel importante na patogênese da NIC (RUNDBACK *et al.*, 2011; ANDREUCCI *et al.*, 2014; DE ALMEIDA *et al.*, 2016; MCCULLOUGH *et al.*, 2016) e o kefir possui importante propriedade antioxidante (NIELSEN *et al.*, 2014; FRIQUES, A. *et al.*, 2015; YENER *et al.*, 2015; KLIPPEL *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2017; SANTANNA *et al.*, 2017), foi necessário observar os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo tanto renal quanto sistêmico. Através dos métodos indiretos e complementares de avaliação de estresse oxidativo (TBARS, AOPP e cometa), pode-se observar que a NIC aumentou todos os parâmetros de forma sistêmica, corroborando estudos anteriores (GUSS *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2019; IORDACHE *et al.*, 2020). Entretanto, para a avaliação da proteção do kefir por vias antioxidantes (mono ou dupla terapia), nossos resultados enfocam um maior efeito antioxidante sistêmico que tecidual (observe que tanto para TBARS e AOPP os dados de proteção tecidual foram mais discretos). Isso pode indicar que os benefícios do kefir podem ultrapassar os efeitos antioxidantes previamente discutidos em outros estudos anteriormente publicados (NIELSEN *et al.*, 2014; FRIQUES, A. *et al.*, 2015; YENER *et al.*, 2015). Por exemplo, sabe-se que a eubiose intestinal pode favorecer a redução da atividade simpática. Ao mesmo tempo, a ocorrência de aumento da atividade do sistema nervoso simpático e disbiose intestinal nas doenças renais já está bem estabelecida, causando aumento da liberação de citocinas e agentes oxidantes na circulação (VAZIRI *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2018). Portanto, nossos dados preliminares abrem novas

oportunidades para investigar mecanismos pelos quais o kefir possa contribuir para essa nefroproteção.

Em relação à genotoxicidade, pode-se observar que no grupo NIC houve um agravamento desse parâmetro, o que já era esperado já que há um aumento do estresse oxidativo nesses animais (KHALEEL *et al.*, 2019). Analisando os níveis de dano ao DNA dos animais do grupo NAC, houve uma melhora significativa, visto que é uma substância antioxidante, diminuindo então as EROs. Embora não tenha sido observado diferenças estatísticas nos grupos pré-tratados com a monoterapia de kefir e em associação com NAC em comparação com NIC, eles também não são maiores, ou seja, não apresentam sinal de agravamento da toxicidade ao DNA. A melhora funcional juntamente com a redução do estresse oxidativo indicam que o kefir é um nutracêutico promissor, mesmo não tendo um efeito expressivo na genotoxicidade.

Além das análises bioquímicas e de estresse oxidativo indireto, a análise morfológica dos glomérulos e túbulos proximais através microscopia eletrônica de varredura permitiu constatar o efeito protetor do probiótico em mono e dupla terapia. Foi possível observar vacuolizações nos túbulos proximais dos animais do grupo NIC, característica esperada já que há um acúmulo de contraste nesse local, aumentando a produção dos radicais livres e favorecendo a aparição de vacúolos, inchaço e apoptose das células tubulares (MCCULLOUGH *et al.*, 2016). Não foi possível observar tais características nos grupos tratados, visto que tanto kefir quanto NAC possuem capacidade vasodilatadoras, diminuindo assim os danos renais (FRIQUES, A. *et al.*, 2015; YENER *et al.*, 2015). Portanto, o ineditismo desse estudo não está apenas na hipótese estabelecida, mas sim na obtenção de dados que se complementam (funcionais, fisiopatológicos e histológicos).

Assim como qualquer investigação experimental, convém também citar algumas limitações do nosso estudo. Infelizmente, não foi possível em tempo hábil obter dados de outros biomarcadores para avaliação de danos tubulares (enzimúria) e de função glomerular prejudicada, como proteinúria e cistatina C. Além disso, pretende-se investigar a influência do kefir no tecido renal pela histologia e parâmetros direto de estresse oxidativo através da citometria de fluxo, quantificando EROs tanto no plasma como no tecido renal, bem como viabilidade e apoptose de células renais.

## 6. CONCLUSÃO

Em resumo, este estudo demonstra pela primeira vez que o kefir é capaz de prevenir os danos promovidos pela nefropatia induzida por contraste, principalmente quando administrado de forma concomitante com a N-acetilcisteína, substância já utilizada para esse fim de forma isolada na prática clínica, porém ainda com eficácia questionável. Esse efeito nefroprotetor é demonstrado através da diminuição dos danos oxidativos sistêmicos e preservação da morfologia e função renal após indução de nefropatia induzida por contraste. Portanto, nosso estudo abre novas oportunidades para a aplicação do kefir em monoterapia ou em associação com o NAC para potencializar seu efeito nefroprotetor, cujas estratégias devem ser investigadas em futuros ensaios clínicos.

### **CONFLITO DE INTERESSES**

Os autores revelam não haver conflito de interesses.



## 7. REFERÊNCIAS

AGMON, Y. et al. NITRIC-OXIDE AND PROSTANOIDS PROTECT THE RENAL OUTER MEDULLA FROM RADIOCONTRAST TOXICITY IN THE RAT. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 3, p. 1069-1075, Sep 1994.

ANDREUCCI, M.; SOLOMON, R.; TASANARONG, A. Side Effects of Radiographic Contrast Media: Pathogenesis, Risk Factors, and Prevention. **Biomed Research International**, p. 20, 2014.

BASILE, D. P.; ANDERSON, M. D.; SUTTON, T. A. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1303-1353, Apr 2012.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245-313, Jan 2007.

BHATTACHARYYA, A. et al. OXIDATIVE STRESS: AN ESSENTIAL FACTOR IN THE PATHOGENESIS OF GASTROINTESTINAL MUCOSAL DISEASES. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329-354, Apr 2014.

BILLINGS, F. T. et al. alpha(2)-adrenergic agonists protect against radiocontrast-induced nephropathy in mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 295, n. 3, p. F741-F748, Sep 2008.

BOA, I. S. F. et al. Resin from *Virola oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. **Plos One**, v. 10, n. 12, Dec 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976

BUYUKLU, M. et al. Protective effect of curcumin against contrast induced nephropathy in rat kidney: what is happening to oxidative stress, inflammation, autophagy and apoptosis? **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 461-470, Feb 2014.

CAMPAGNARO, B. P. et al. Renovascular Hypertension Leads to DNA Damage and Apoptosis in Bone Marrow Cells. **DNA and Cell Biology**, v. 32, n. 8, p. 458-466, Aug 2013.

CHEN, Y. H. et al. Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antifibrotic Effects of Kefir Peptides on Salt-Induced Renal Vascular Damage and Dysfunction in Aged Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 18, Sep 2020.

DE ALMEIDA, L. S. et al. Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in Wistar rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 35, n. 11, p. 1194-1202, Nov 2016.

EVENEPOEL, P.; POESEN, R.; MEIJERS, B. The gut-kidney axis. **Pediatric Nephrology**, v. 32, n. 11, p. 2005-2014, Nov 2017.

FAHLING, M. et al. Understanding and preventing contrast-induced acute kidney injury. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 3, p. 169-180, Mar 2017.

FARRAR, A. Acute Kidney Injury. **Nursing Clinics of North America**, v. 53, n. 4, p. 499-+, Dec 2018.

FREI, R.; AKDIS, M.; O'MAHONY, L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, n. 2, p. 153-158, Mar 2015.

FRIQUES, A. et al. The Probiotic Kefir Improves Cardiovascular Function in Spontaneously Hypertensive Rats. **Faseb Journal**, v. 29, Apr 2015.

FRIQUES, A. G. F. et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, Dec 2015.

GIL-CARDOSO, K. et al. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. **British Journal of Nutrition**, v. 117, n. 2, p. 218-229, Jan 2017.

GOLMAN, K.; HOLTAS, S. PROTEINURIA PRODUCED BY UROGRAPHIC CONTRAST-MEDIA. **Investigative Radiology**, v. 15, n. 6, p. S61-S66, 1980.

GONSALEZ, S. R. et al. Acute kidney injury overview: From basic findings to new prevention and therapy strategies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 200, p. 1-12, Aug 2019.

GUSS, K. L. et al. Ultrasound-assisted extraction of Achyrocline satureioides prevents contrast-induced nephropathy in mice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 368-374, Jul 2017.

GUZEL-SEYDIM, Z. B. et al. Review: Functional Properties of Kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 3, p. 261-268, 2011.

HANASAND, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 9-10, p. 901-906, May 2012.

HOSSAIN, M. A. et al. Contrast-Induced Nephropathy: Pathophysiology, Risk Factors, and Prevention. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 29, n. 1, p. 1-9, Jan-Feb 2018.

IORDACHE, A. M. et al. Sildenafil and tadalafil reduce the risk of contrast-induced nephropathy by modulating the oxidant/antioxidant balance in a murine model. **Food**

**and Chemical Toxicology**, v. 135, Jan 2020.

KAHRAMAN, M.; ERTEKIN, Y. H.; SATMAN, I. The Effects of Kefir on Kidney Tissues and Functions in Diabetic Rats. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 2, p. 375-382, Apr 2021.

KANBAK, G. et al. Effect of kefir and low-dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in unihypertensive rats with 4 weeks salt diet. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 36, n. 1, p. 1-8, 2014.

KHALEEL, S. A. et al. Contrast media (meglumine diatrizoate) aggravates renal inflammation, oxidative DNA damage and apoptosis in diabetic rats which is restored by sulforaphane through Nrf2/HO-1 reactivation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 309, p. 10, Aug 2019.

KHOURY, T. et al. The gut-kidney axis in chronic renal failure: A new potential target for therapy. **Hemodialysis International**, v. 21, n. 3, p. 323-334, Jul 2017.

KISS, N.; HAMAR, P. Histopathological Evaluation of Contrast-Induced Acute Kidney Injury Rodent Models. **Biomed Research International**, p. 15, 2016.

KLIPPEL, B. F. et al. Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 7, Jun 2016.

KONGKHAM, S.; SRIWONG, S.; TASANARONG, A. Protective effect of alpha tocopherol on contrast-induced nephropathy in rats. **Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 116-123, 2013.

KUSIRISIN, P.; CHATTIPAKORN, S. C.; CHATTIPAKORN, N. Contrast-induced nephropathy and oxidative stress: mechanistic insights for better interventional approaches. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 35, Oct 2020.

LEE, H. T. et al. A(1) adenosine receptor knockout mice are protected against acute radiocontrast nephropathy in vivo. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 290, n. 6, p. F1367-F1375, Jun 2006.

LEMOS, V. R. et al. Benefits of multi-day supplementation with probiotic kefir in Rasmussen encephalitis: the first case report. **Nutritional Neuroscience**, p. 8, 2021

LEVEY, A. S.; JAMES, M. T. Acute Kidney Injury. **Annals of Internal Medicine**, v. 167, n. 9, p. ITC65-+, Nov 2017.

LOUIS, P.; FLINT, H. J.; MICHEL, C. How to Manipulate the Microbiota: Prebiotics. In: SCHWIERTZ, A. (Ed.). **Microbiota of the Human Body: Implications in Health and Disease**. Cham: Springer International Publishing Ag, v.902, 2016. p.119-142. (Advances in Experimental Medicine and Biology).

MAMOULAKIS, C. et al. Contrast-induced nephropathy: Basic concepts, pathophysiological implications and prevention strategies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 180, p. 99-112, Dec 2017.

MARKOWIAK, P.; SLIZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 30, Sep 2017.

MCCULLOUGH, P. A.; AKRAWINTHAWONG, K. Ascorbic Acid for the Prevention of Contrast-Induced Acute Kidney Injury. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 23, p. 2176-2177, Dec 2013.

MCCULLOUGH, P. A. et al. Contrast-Induced Acute Kidney Injury. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 68, n. 13, p. 1465-1473, Sep 2016.

MIRANDA, A. S. et al. Kidney-brain axis inflammatory cross-talk: from bench to bedside. **Clinical Science**, v. 131, n. 11, p. 1093-1105, Jun 2017.

MOSELHY, H. F. et al. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 3, p. 852-858, Mar 2013.

NIELSEN, B.; GURAKAN, G. C.; UNLU, G. Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 3-4, p. 123-135, Dec 2014.

PATOCKOVA, J. et al. Cerebrolysin inhibits lipid peroxidation induced by insulin hypoglycemia in the brain and heart of mice. **Physiological Research**, v. 52, n. 4, p. 455-460, 2003.

PUNARO, G. R. et al. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. **Nitric Oxide**, v. 37, p. 53-60, Feb 2014a.

\_\_\_\_\_. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 37, p. 53-60, Feb 2014b.

ROSA, D. D. et al. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, v. 30, n. 1, p. 82-96, Jun 2017.

RUNDBACK, J. H.; NAHL, D.; YOO, V. Contrast-induced nephropathy. **Journal of Vascular Surgery**, v. 54, n. 2, p. 575-579, Aug 2011.

SANTANNA, A. F. et al. Chronic administration of the soluble, nonbacterial fraction of kefir attenuates lipid deposition in LDLr<sup>-/-</sup> mice. **Nutrition**, v. 35, p. 100-105, Mar 2017.

SANTOS, V. D. et al. Silymarin protects against radiocontrast-induced nephropathy

in mice. **Life Sciences**, v. 228, p. 305-315, Jul 2019.

SPIRLANDELI, A. L.; DEMINICE, R.; JORDAO, A. A. Plasma Malondialdehyde as Biomarker of Lipid Peroxidation: Effects of Acute Exercise. **International Journal of Sports Medicine**, v. 35, n. 1, p. 14-18, Jan 2014.

SUBRAMANIAM, R. M. et al. Effectiveness of Prevention Strategies for Contrast-Induced Nephropathy A Systematic Review and Meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 164, n. 6, p. 406-+, Mar 2016.

TOMASELLO, G. et al. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. **Biomedical Papers-Olomouc**, v. 160, n. 4, p. 461-466, 2016.

TON, A. M. M. et al. Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 14, Jan 2020.

VAZIRI, N. D. et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. **Kidney International**, v. 83, n. 2, p. 308-315, Feb 2013.

WEISBORD, S. D. et al. Outcomes after Angiography with Sodium Bicarbonate and Acetylcysteine. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 7, p. 603-614, Feb 2018.

WITKOSARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49, n. 5, p. 1304-1313, May 1996.

YANG, T. et al. The gut microbiota and the brain-gut-kidney axis in hypertension and chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 442-456, Jul 2018.

YENER, A. U. et al. Effects of kefir on ischemia-reperfusion injury. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 5, p. 887-896, Mar 2015.