

A ingestão prévia de castanha-do-brasil atenua a lesão renal induzida por isquemia e reperfusão

Prior intake of Brazil nuts attenuates renal injury induced by ischemia and reperfusion

Autores

Natassia Alberici Anselmo¹

Leticia Colombo
Paskakulis¹

Renata Correia Garcias¹

Fernanda Fortuci Resende
Botelho¹

Giovana Queda Toledo¹

Maria Fernanda Ribeiro
Cury¹

Natiele Zanardo Carvalho¹

Glória Elisa Florido
Mendes¹

Tatiane Iembo¹

Thaís Santana Gastardelo
Bizotto¹

Patricia Maluf Cury¹

Aginaldo Bruno Chies²

Carla Patrícia Carlos¹

¹ Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FACERES, Laboratório de Pesquisa Experimental, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

² Faculdade de Medicina de Marília, Laboratório de Farmacologia, Marília, SP, Brasil.

Data de submissão: 09/06/2017.

Data de aprovação: 30/08/2017.

Correspondência para:

Carla Patrícia Carlos.
E-mail: carlamolina@terra.com.br

RESUMO

Introdução: a lesão por isquemia-reperfusão (IR) resulta, entre outros fatores, de inflamação e estresse oxidativo. Devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, a castanha-do-brasil (BN) pode atenuar a lesão renal causada por IR. **Objetivo:** O objetivo foi investigar se a ingestão prévia de BN reduz a lesão e a inflamação renal causadas por IR, melhorando a função renal e o estresse oxidativo. **Métodos:** Ratos Wistar machos foram distribuídos em seis grupos (N=6/grupo): SHAM (controle), SHAM tratado com 75 ou 150 mg de BN, IR, e IR tratado com 75 ou 150 mg de BN. O procedimento de IR consistiu na nefrectomia à direita e oclusão da artéria renal esquerda por 30 minutos. A castanha foi administrada diariamente e individualmente por sete dias antes da cirurgia (SHAM ou IR), e mantida até o sacrifício (48h pós-cirurgia). Os seguintes parâmetros foram avaliados: creatinina, ureia e fósforo plasmáticos; proteinúria, volume urinário e depuração de creatinina; TBARS e TEAC (capacidade antioxidante) plasmáticos; expressão renal de iNOS e nitrotirosina, e influxo de macrófagos. **Resultados:** O pré-tratamento com 75 mg de BN atenuou os parâmetros de função renal alterados pela IR, com elevação da depuração de creatinina e o volume urinário, redução da proteinúria, ureia e fósforo plasmáticos, e diminuição da expressão de iNOS, nitrotirosina e da infiltração de macrófagos. **Conclusão:** A ingestão de baixa quantidade de BN, previamente ao processo de IR, melhora a função renal pela inibição da infiltração de macrófagos e do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Isquemia; Reperfusão; Lesão renal aguda; Estresse oxidativo; Inflamação; Castanha-do-brasil; Ratos.

ABSTRACT

Introduction: Ischemia-reperfusion (IR) injury results from inflammation and oxidative stress, among other factors. Because of its anti-inflammatory and antioxidant properties, the Brazil nut (BN) might attenuate IR renal injury. **Objective:** The aim of the present study was to investigate whether the intake of BN prevents or reduces IR kidney injury and inflammation, improving renal function and decreasing oxidative stress. **Methods:** Male Wistar rats were distributed into six groups (N=6/group): SHAM (control), SHAM treated with 75 or 150 mg of BN, IR, and IR treated with 75 or 150 mg of BN. The IR procedure consisted of right nephrectomy and occlusion of the left renal artery with a non-traumatic vascular clamp for 30 min. BN was given daily and individually for 7 days before surgery (SHAM or IR) and maintained until animal sacrifice (48h after surgery). We evaluated the following parameters: plasma creatinine, urea, and phosphorus; proteinuria, urinary output, and creatinine clearance; plasmatic TBARS and TEAC; kidney expression of iNOS and nitrotyrosine, and macrophage influx. **Results:** Pre-treatment with 75 mg of BN attenuated IR-induced renal changes, with elevation of creatinine clearance and urinary output, reducing proteinuria, urea, and plasmatic phosphorus as well as reducing kidney expression of iNOS, nitrotyrosine, and macrophage influx. **Conclusion:** Low intake of BN prior to IR-induced kidney injury improves renal function by inhibition of macrophage infiltration and oxidative stress.

Keywords: Ischemia; Reperfusion injury; Acute kidney injury; Oxidative stress; Inflammation; Brazil nuts; Rats.

INTRODUÇÃO

Isquemia e reperfusão inevitavelmente ocorrem durante o transplante de órgãos, e são uma das causas da insuficiência renal aguda e rejeição do enxerto. A hipóxia causa danos às células tubulares, mas a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) após a reperfusão do sangue induz danos irreversíveis. Uma cascata de respostas celulares deletérias leva a inflamação, morte celular e falência de órgãos.¹⁻⁴ Apesar dos avanços na área, a taxa de mortalidade por insuficiência renal aguda é alta. Assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos na lesão causada pela isquemia-reperfusão (IR) é essencial para definir estratégias para minimizar as consequências dos procedimentos envolvidos no transplante renal. Assim, investigamos a ação protetora da castanha-do-brasil, *Bertholettia excelsa* (BN), na lesão renal aguda causada pelo processo IR em ratos.

Um número crescente de estudos mostrou a ação benéfica da BN em humanos. Esta castanha contém compostos bioativos como selênio, tocoferol, compostos fenólicos, ácido fólico, magnésio, potássio, cálcio, proteínas e ácidos graxos mono e poliinsaturados.⁵⁻⁶ O consumo regular dessas castanhas melhora o perfil lipídico e a função cardiovascular, reduz o estresse oxidativo em adolescentes obesos⁷ e em indivíduos com síndrome metabólica,⁸ e reduz o risco aterogênico em mulheres obesas, com aumento da atividade da glutatona-peroxidase.⁹ A ingestão de uma única porção de 20 a 50 g de BN por voluntários saudáveis reduz os marcadores da inflamação, como IL-1 (interleucina 1), IL-6, TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IFN- γ (interferon gama),¹⁰ e melhora o perfil lipídico por um período superior a 30 dias.¹¹ Além disso, foi demonstrado que a BN exerce uma ação protetora contra o câncer em modelo experimental em ratos.¹²⁻¹³ Esses estudos destacam a ação benéfica da BN em doenças relacionadas ao estresse oxidativo e à inflamação.

Dado o risco aumentado de mortalidade por insuficiência renal aguda e o fato de que as atividades anti-inflamatórias e antioxidantes da BN terem sido pouco exploradas na lesão renal, avaliamos essas ações em um modelo *in vivo* de ratos com lesão renal por IR. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar se a ingestão dessas castanhas previne ou reduz a lesão renal e a inflamação, melhorando a função renal e diminuindo o estresse oxidativo.

MÉTODOS

ÉTICA

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram executados de acordo com os padrões éticos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA da Faculdade de Medicina FACERES (número de aprovação 001/2015).

ANIMAIS E PROCEDIMENTOS

Ratos Wistar machos (200-220 g) foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (N = 6/grupo): SHAM (controle), sham tratado com 75 mg de BN (SHAM + BN75), sham tratado com 150 mg de BN (SHAM + BN150), IR não tratado, IR tratado com 75 mg de BN (IR + BN75) e IR tratado com 150 mg de BN (IR + BN150). Os animais foram alojados sob um ciclo luz-escurecimento de 12:12 h e tiveram acesso *ad libitum* a alimentos e água.

O procedimento de IR consistiu em nefrectomia direita e oclusão da artéria renal esquerda com grampo vascular não-traumático durante 30 min sob anestesia (xilazina 10 mg / Kg + ketamina 85 mg / Kg).¹⁴⁻¹⁵

A BN (75 ou 150 mg/animal, Belém do Pará, Brasil) foi administrada diariamente e individualmente por 7 dias antes da cirurgia (SHAM e IR) e mantida até a eutanásia (48h após a cirurgia). As doses foram selecionadas de acordo com estudos prévios em seres humanos sem efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos.⁷⁻¹¹

Os animais dos grupos SHAM foram submetidos à mesma anestesia e procedimentos cirúrgicos descritos acima, mas sem oclusão da artéria renal. Os animais foram sacrificados 48 h após a reperfusão com uma sobredosagem de anestésico (100 mg/Kg de tiopental).

No final da cirurgia, todos os animais receberam 2 mg/kg de tramadol por gavagem para controle da dor pós-operatória, sendo mantidos em gaiolas individuais, alimento e água à vontade por 48 horas. A ingestão de BN foi mantida até o sacrifício de acordo com o grupo.

ESTUDO DA FUNÇÃO RENAL

Um dia após os procedimentos de IR e SHAM, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas com volume de urina coletado e medido por 24 h; amostras foram colhidas ao final deste período. Após a eutanásia, amostras de sangue e rins foram colhidas. Os níveis de creatinina e proteinúria foram medidos através de um exame colorimétrico

na urina de 24 horas, bem como creatinina, ureia e fósforo em amostras de plasma.

ESTRESSE OXIDATIVO PLASMÁTICO

As análises de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) foram realizadas em amostras de plasma. A determinação do TBARS foi feita pela quantificação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, gerando uma cor que pode ser detectada em um espectrofotômetro (535 nm, BIO-200S, Bioplus, São Paulo, SP, Brasil) e comparada à leitura de absorvência do padrão de malondialdeído (20 µM/L).¹⁶⁻¹⁷ O TEAC foi determinado de acordo com a equivalência com o potente antioxidante Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; Sigma-Aldrich Chemical Co., 23881-3), um análogo sintético solúvel em água da vitamina E, com leitura de absorvência a 734 nm por espectrofotometria.¹⁸

LESÃO RENAL

Para análises histopatológica e imunohistoquímica, os rins foram fixados em paraformaldeído a 4% em PBS 0,1 M (pH 7,4) durante 24 h a 4 ° C, embebidos em parafina, corados com hematoxilina-eosina e avaliados em um microscópio Primo Star (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). A necrose tubular aguda foi avaliada na região justamedular, e os escores foram atribuídos em duplo-cego em seções de tecidos dos segmentos justamedulares da seguinte forma: 0 (nenhum campo afetado), 1 (até 25% afetados), 2 (26 a 50% afetados), 3 (51 a 75% afetados) e 4 (76 a 100% afetados), conforme descrito anteriormente.¹⁴

INFILTRAÇÃO DE MACRÓFAGOS NOS RINS E ESTRESSE OXIDATIVO

Para estudar a localização específica de macrófagos ED-1 positivos, iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e nitrotirosina, foram utilizadas seções de 3 um rins embebidas em parafina. Este procedimento foi realizado como descrito anteriormente¹⁹⁻²⁰ e o método consistiu em uma reação de imunoperoxidase. Os fragmentos de tecido foram incubados durante a noite a 4 ° C com um anticorpo primário monoclonal anti-iNOS (1:10, sc-7271, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), ou durante 1h à temperatura ambiente com um anticorpo monoclonal primário anti-ED- 1 Ab (1: 1000, MCA341R, Serotec, Oxford, Reino Unido), ou anticorpo primário monoclonal anti-nitrotirosina (1: 400, SC-32757, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). As análises quantitativas de

macrófagos ED-1 e iNOS foram realizadas em seções de tecido dos segmentos justamedulares de forma cega, com a contagem sendo realizada usando um microscópio Primo Star (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Para as análises de nitrotirosina, foi utilizada uma lâmina de cada animal (n = 6 por grupo) e foram observados 25 campos na região justamedular do rim para obter uma pontuação média, como descrito anteriormente para a histopatologia.¹⁹⁻²⁰

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise descritiva e determinação da normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Aplicamos a análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls para comparações múltiplas de amostras com distribuição normal. O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi utilizado para amostras com distribuição não-normal. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

A CASTANHA-DO-BRASIL NÃO MELHORA A LESÃO RENAL

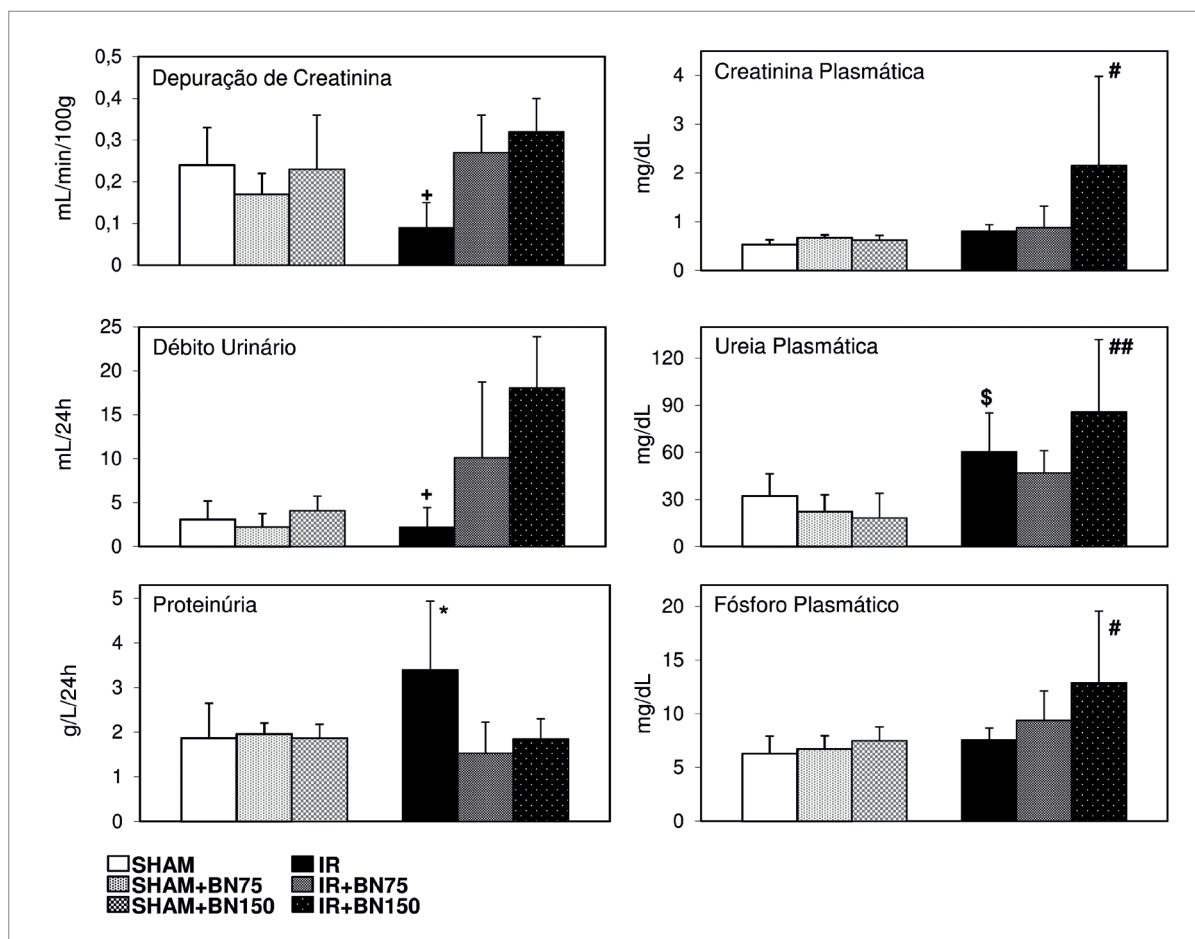
Foi observada lesão tecidual leve a moderada na região justamedular dos rins dos grupos IR, tratados ou não com 75 mg e 150 mg de BN. A necrose tubular aguda foi caracterizada pela presença de células tubulares necróticas vacuolizadas e acidofilia intensa, picnose, cariólise, cariorrexe, casts no lúmen tubular, perda da borda da borda em escova e presença de células inflamatórias. Não houve diferença significativa nos escores de necrose tubular aguda entre os grupos SHAM e IR ($0,5 \pm 0,84$ SHAM *vs.* $1,71 \pm 0,95$ IR, $0,4 \pm 0,89$ SHAM + BN75, $0,83 \pm 0,98$ SHAM + BN150, $2,5 \pm 1,38$ IR + BN75 e $2,83 \pm 1,17$ IR + BN150; $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis).

A CASTANHA-DO-BRASIL MELHORA A FUNÇÃO RENAL PREJUDICADA PELA IR

A função renal diminuiu significativamente no grupo IR (Figura 1). Os animais apresentaram aumento de ureia plasmática e proteinúria, e redução do volume urinário e do clearance da creatinina, e esses efeitos foram neutralizados pelo tratamento prévio com 75 mg de BN. No entanto, o tratamento com 150 mg de BN aumentou os níveis plasmáticos de creatinina, ureia e fósforo em comparação com os demais grupos.

Os animais de todos os grupos perderam uma média de 23g após os procedimentos cirúrgicos, e

Figura 1. A castanha-do-brasil melhora a função renal prejudicada pela isquemia-reperfusão (IR). A função renal diminuiu significativamente no grupo submetido ao processo de IR. Esses animais apresentaram aumento da ureia plasmática e proteinúria e redução do volume urinário e clearance de creatinina. O tratamento com 75 mg de castanha-do-brasil (BN75) neutralizou os efeitos da IR na função renal, em comparação com os grupos de controle (SHAM) tratados ou não com castanha-do-brasil (BN75) e grupo IR. No entanto, 150 mg de castanha-do-brasil (BN150) elevou a creatinina, ureia e fósforo plasmáticos. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$, IR versus todos os grupos; + $p < 0,05$ IR v.s. IR + BN75 e IR + BN150; § $p < 0,05$ IR v.s. grupos SHAM; # $p < 0,05$ IR + BN150 versus todos os grupos; ## $p < 0,01$ IR + BN150 v.s. grupos SHAM; n = 6/grupo (ANOVA + Teste de Newman-Keuls).



nenhuma diferença foi detectada entre eles (dados não apresentados).

A CASTANHA-DO-BRASIL REDUZ O INFLUXO DE MACRÓFAGOS NO RIM

Após o procedimento de IR, os animais exibiram um influxo aumentado de macrófagos na região justamedular (Figuras 2D-H) quando comparados aos demais grupos. Foi observada uma redução da transmigração de macrófagos em animais tratados com 75 (Figura 2E e H) ou 150 mg (Figura 2F e H) de BN. Os animais IR tratados com BN, em doses baixas ou altas, apresentaram um número semelhante de macrófagos em comparação com os controles SHAM (Figura 2A-C e H).

A CASTANHA-DO-BRASIL REDUZ O ESTRESSE OXIDATIVO NOS RINS E NO SANGUE

O processo de IR elevou a expressão de nitrotirosina (Figura 3.1D e H) e iNOS (Figura 3.2D e H) no

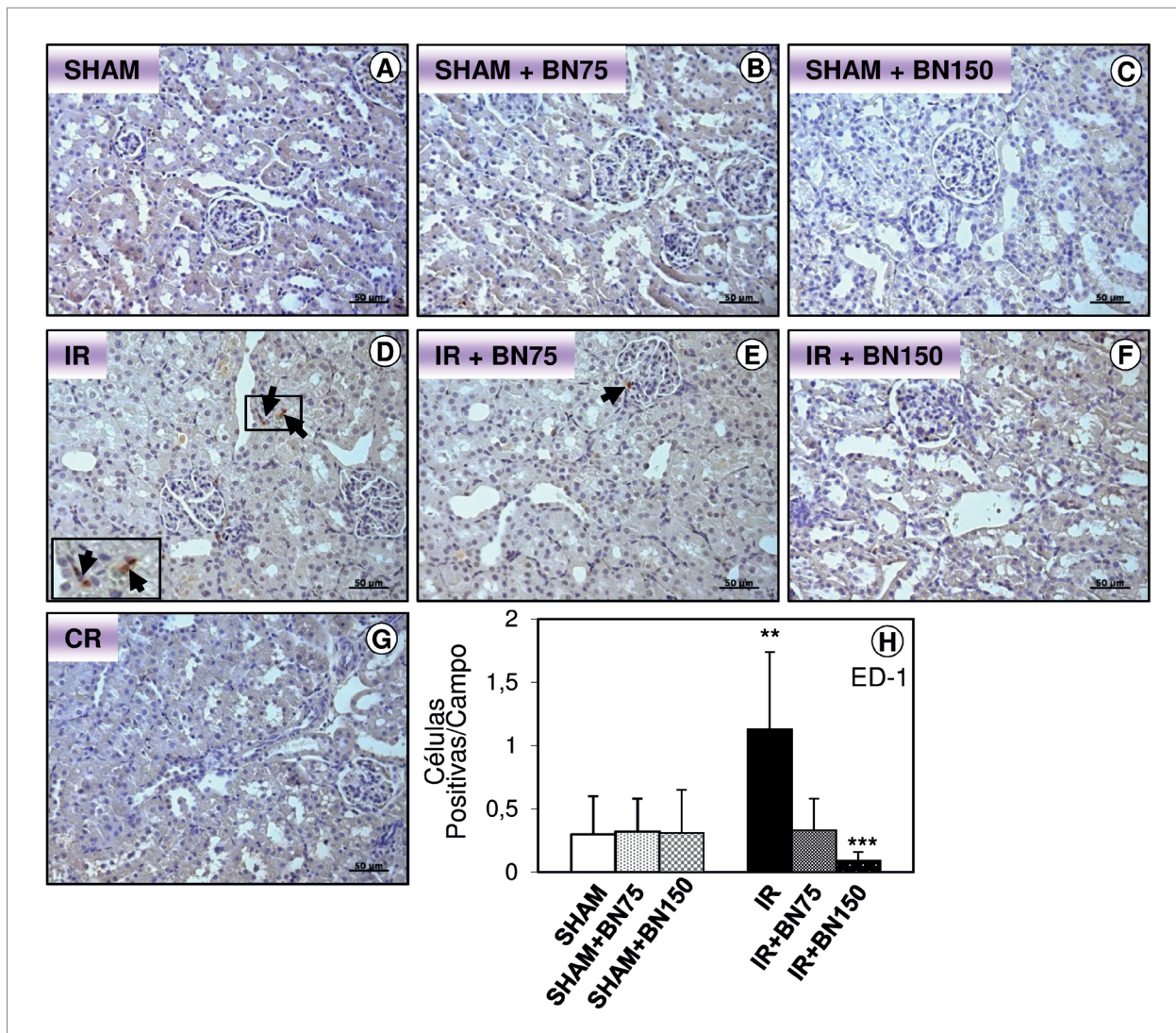
rim, bem como elevou o nível de TBARS no sangue (Figura 3.3A). O tratamento prévio com 75 mg de BN reduziu esses marcadores de estresse oxidativo. A dosagem de 150 mg de BN induziu um efeito semelhante à baixa dose (Figuras 3.1F e H, 3.2F e H e 3.3A).

Não houve diferença significativa no nível de TEAC entre os grupos SHAM e IR (Figura 3.3B).

DISCUSSÃO

A lesão renal induzida por IR promove a liberação de EROs e mediadores pró-inflamatórios, e o recrutamento de moléculas de adesão e leucócitos que, em conjunto, induzem disfunção renal e mortalidade.^{1,4,21-22} No presente estudo, um modelo *in vivo* de IR renal em rato, foi usado para testar a castanha-do-brasil (BN) como agente para atenuar a lesão de IR no rim.

Figura 2. castanha-do-brasil reduz o influxo de macrófagos para o rim. (D) O grupo IR apresentou aumento de macrófagos (setas). Não houve diferença no influxo de macrófagos entre os grupos SHAM (A), SHAM tratado com 75 mg (B) ou 150 mg (C) de castanha-do-brasil e IR tratado com 75 mg (E) ou 150 mg (F) de castanha-do-brasil. (G) Controle da reação (CR). Contra-coloração: Hematoxilina. (H) Número de células positivas por campo. Barras: 50 μ m. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão da imunorreatividade da proteína, n = 6/grupo. ** $p < 0,01$ IR versus todos os grupos; *** $p < 0,001$ IR + BN150 v.s. IR; ANOVA + Teste de Newman-Keuls.

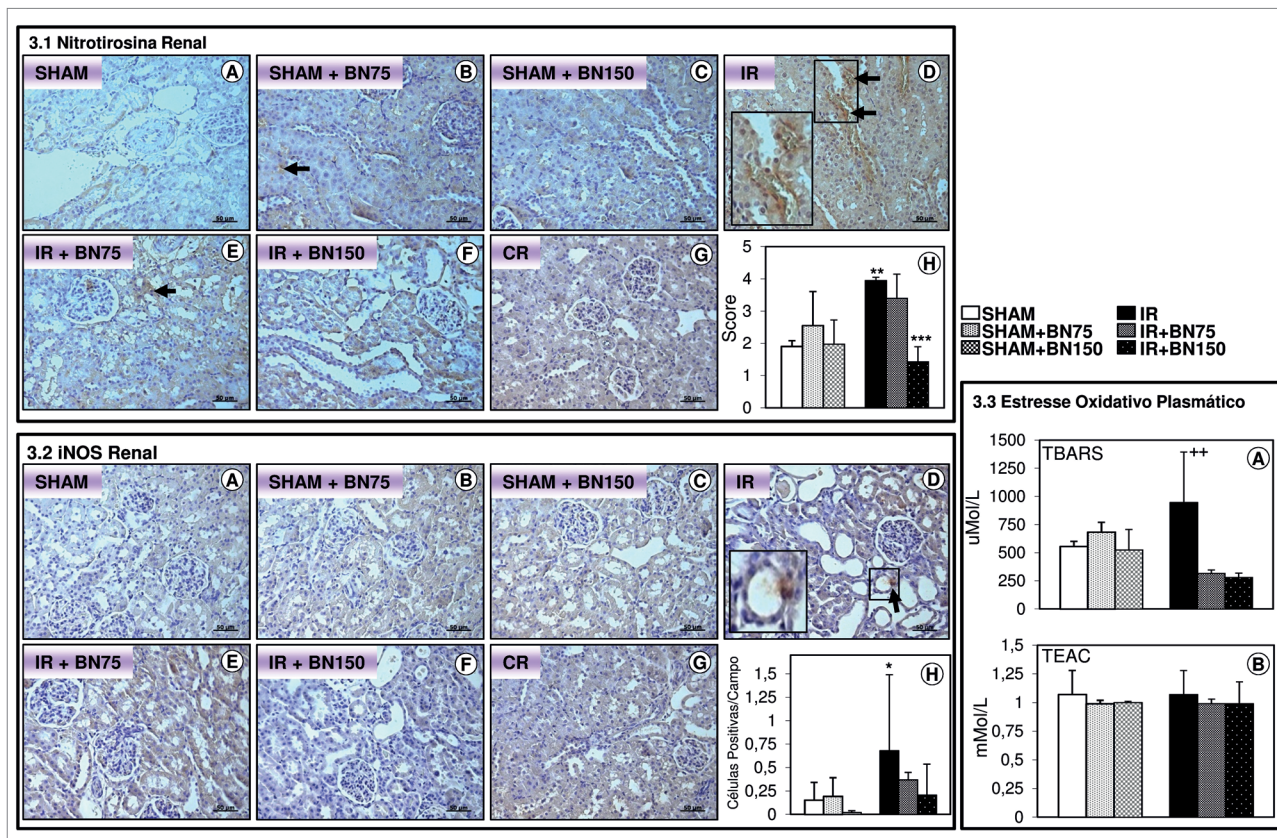


Verificamos que o tratamento com 75 mg de BN sete dias antes do processo de IR reverteu os efeitos deletérios da IR na função renal, com redução de uréia plasmática e proteinúria, e aumento do clearance de creatinina e débito urinário. No entanto, a análise histopatológica não revelou diferença na necrose tubular aguda entre os grupos de IR. Esses resultados indicam um efeito protetor parcial da BN, que está de acordo com outros estudos sobre tratamentos alternativos para lesão de IR.²³⁻²⁵

Além disso, o grupo IR apresentou influxo elevado de macrófagos nos rins, um efeito abolido por ambas as dosagens de BN. Os macrófagos, indetectáveis em rins normais, têm sido usados como

indicadores precoces de danos renais em humanos e roedores^{22,26-29}. Nosso achado confirma a lesão renal induzida por IR e o efeito protetor parcial da BN. A IR provoca influxo precoce de macrófagos no tecido renal^{1,22,28} dentro de 1 h após a reperfusão e o influxo,¹ que precedem a redução na taxa de filtração glomerular. Esta infiltração está relacionada a um aumento de fatores quimiotáticos.^{1,22} Diferentes processos inflamatórios renais, como isquemia e reperfusão^{22,28} e rejeição de aloenxertos,²⁶⁻²⁷ são caracterizados por um aumento de fatores quimiotáticos, incluindo a proteína quimioatratadora de monócitos^{27-28, 30} e fator estimulante das colônias de macrófagos.²⁹ Os monócitos atravessam o endotélio vascular e migram para

Figura 3. A castanha-do-brasil reduz o estresse oxidativo nos rins e no sangue. 3.1 Expressão de nitrotirosina no rim. (D) O grupo IR apresentou maior expressão de nitrotirosina (setas) em comparação com o grupo SHAM (A). Não houve diferença na expressão entre os grupos SHAM (A), SHAM tratados com 75 mg (B) ou com 150 mg (C) e IR tratados com 75 mg (E) ou com 150 mg (F) de castanha-do-brasil. 3.2 Expressão de iNOS no rim. (D) O grupo IR apresentou maior expressão de iNOS (setas) em comparação com o grupo SHAM tratado com 150 mg de castanha-do-brasil (C). Não houve diferença na expressão entre os grupos SHAM (A), SHAM tratados com 75 mg (B) ou com 150 mg (C) e IR tratados com 75 mg (E) ou com 150 mg (F) de castanha-do-brasil. 3.3 Níveis de TBARS e TEAC no plasma. (A) O grupo IR apresentou TBARS plasmático aumentado (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), em comparação com o grupo IR tratado com 150 mg de castanha (IR + BN150). Não houve diferenças entre SHAM, SHAM + BN75 ou SHAM + BN150 e IR tratados com 75 ou 150 mg de castanha. (B) O nível de TEAC (capacidade antioxidante equivalente de Trolox) foi semelhante entre todos os grupos ($p > 0,05$). (G) Controle da reação (CR). Contracoloração: Hematoxilina. Barras: 50 μ m. (H) Score médio ou células positivas por campo. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão da imunoreatividade da proteína, $n = 6$ /grupo. * $p < 0,05$ IR v.s. SHAM + BN150; ** $p < 0,01$ IR v.s. SHAM; *** $p < 0,001$ IR + BN150 v.s. IR; ++ $p < 0,01$ IR v.s. IR + BN150, teste de Kruskal-Wallis.



o tecido danificado, gerando macrófagos que produzem mediadores inflamatórios, dentre eles, o fator beta de transformação do crescimento (TGF- β), o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas 1, 6 e 12.^{22,27-29,31} Os resultados apresentados demonstram um efeito protetor da BN sobre a inflamação causada pela IR, com redução significativa da transmigração dessas células nos rins dos animais tratados por 7 dias antes da cirurgia de IR. Isto foi observado com as duas doses de BN (75 e 150 mg) e corroborou a ação anti-inflamatória encontrada em estudos com consumo de BN por humanos saudáveis¹⁰ e por pacientes com doença renal.³²⁻³⁴

Além dos mediadores inflamatórios, os macrófagos estão relacionados ao aprimoramento de ON, ERO, nitrotirosina e inflamação.^{21,30,35} O ON pode estar envolvido na ação de macrófagos através do estresse oxidativo em várias manifestações de nefrotoxicidade. Durante a

inflamação, o óxido nítrico (ON) é sintetizado pela iNOS que é induzida pela ativação de citocinas e expressa em condições patológicas; os macrófagos são a principal fonte de produção de ON.³⁶⁻³⁸ A nitrotirosina é o resultado da formação de peroxinitrito e ERO, e como a iNOS, é um marcador de estresse nitrosativo.^{35,39-41} De acordo com esses autores e paralelamente ao recrutamento dos macrófagos, nosso estudo também encontrou TBARS elevado no plasma e expressão renal de iNOS/nitrotirosina causada por IR. Essas alterações foram neutralizadas pelos tratamentos com BN e seus compostos bioativos,⁵⁻⁶ que associada à redução do influxo de macrófagos, pode ter contribuído para esta ação antioxidante. Estes resultados corroboram um estudo que demonstrou redução da expressão do fator nuclear kappa beta nas células mononucleares no sangue periférico e diminuição do estresse oxidativo, citocinas e níveis de malondialdeído em pacientes em hemodiálise que receberam suplementação

de BN.³²⁻³⁴ Além disso, a ingestão de BN melhora a atividade da glutathione peroxidase em mulheres obesas⁹ e adolescentes⁷. Assim, nossos dados confirmam os resultados da literatura sobre o efeito antioxidante protetor da BN.

A expressão de nitrotirosina renal no grupo IR + BN150 foi menor que o grupo IR, mas não em relação ao grupo IR + BN75. A baixa dose de 75 mg de BN pode não ter sido suficiente para reduzir a expressão renal de nitrotirosina, embora tenha reduzido o nível plasmático de TBARS. Além disso, apesar do efeito relatado sobre a proteção conferida pela defesa antioxidante da glutathione pela BN⁹, não encontramos melhora no nível plasmático de TEAC nos animais IR. Isso pode ter ocorrido porque o tratamento durou 9 dias, enquanto em outros estudos foi de 8 a 16 semanas.^{7,9}

Outro mecanismo de estresse oxidativo envolve a eNOS (NOS endotelial). A atividade da eNOS é dependente da disponibilidade do cofator tetrahidrobiopterina (BH4) e outros cofactores.⁴² As EROs afetam indiretamente a biodisponibilidade do NO desacoplando a eNOS pela oxidação do BH4. A eNOS desacoplada produz superóxido ao contrário de NO.^{3,42} Assim, propõe-se a supressão de eNOS pela alta produção de NO via iNOS, que tem um papel fundamental na disfunção endotelial na isquemia renal aguda. O desacoplamento de eNOS e a produção defeituosa de NO resulta em prejuízo da vasodilatação das artérias de resistência renal, agravando a lesão de IR.⁴³ Este mecanismo de desacoplamento da eNOS pode estar envolvido no presente modelo de lesão renal, uma vez que a expressão de iNOS está elevada nos animais submetidos a IR. Possivelmente, a administração de BN exerce um duplo efeito protetor (anti-inflamatório e antioxidante), reduzindo a infiltração de macrófagos com consequente redução da expressão de iNOS e auxiliando a preservar a atividade da eNOS no tecido renal.

No entanto, ao contrário do tratamento com 75 mg de BN, a função renal dos animais submetidos a IR piorou com a ingestão de 150 mg de BN. Os níveis plasmáticos de creatinina, ureia e fósforo foram elevados em relação aos demais grupos. A explicação para este efeito deletério pode estar nas elevadas concentrações de fósforo e aminoácidos contidas na BN.⁶ Os distúrbios eletrolíticos são comumente observados em doenças renais, e o suporte nutricional é frequentemente necessário,⁴⁴ assim como uma baixa ingestão de proteína.^{23,45} Portanto, um alto consumo

dessas castanhas pode prejudicar esse manejo nutricional. Na verdade, a quantidade recomendada é de uma castanha por dia para pacientes em hemodiálise, para obter o efeito protetor anti-inflamatório e antioxidante.³²

O presente estudo tem algumas limitações. A análise histopatológica não mostrou diferença entre os grupos, o que pode ser devido ao pequeno número de animais; com uma amostra maior, poderíamos encontrar uma diferença estatisticamente significativa como observada por outros autores.^{15,28-29,36} No entanto, a condição de IR foi confirmada pela elevada infiltração de macrófagos e diminuição da função renal em comparação com os demais grupos. Nosso estudo demonstra uma estratégia nutricional interessante para minimizar os efeitos nocivos da lesão por IR. São necessários mais estudos para caracterizar os compostos presentes na BN, responsáveis por estes efeitos protetores.

CONCLUSÃO

Concluímos que uma baixa ingestão de BN antes da lesão renal induzida por IR melhora a função renal pela inibição da infiltração de macrófagos e do estresse oxidativo.

AGRADECIMENTOS

Este projeto foi apoiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processos 2015/08232-3, 2015/18313-0, 2015/25616-0 e 2016/10316-3. Agradecimentos especiais à Dra. Doroteia Rossi da Silva Souza, Dra. Denise Poltronieri Martins e Dra. Camila Ive Ferreira Oliveira, NPBIM, FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, e à Dra. Marcela Pinhel, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, SP, pelo treinamento laboratorial para os procedimentos técnicos de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

1. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol* 2008;109:e102-7.
2. Rubinstein I, Abassi Z, Milman F, Ovcharenko E, Coleman R, Winaver J, et al. Hyperbaric oxygen treatment improves GFR in rats with ischaemia/reperfusion renal injury: a possible role for the antioxidant/oxidant balance in the ischaemic kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:428-36.
3. Kleikers PW, Wingler K, Hermans JJ, Diebold I, Altenhöfer S, Radermacher KA, et al. NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *J Mol Med* 2012;90:1391-1406.
4. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev* 2015;4:20-7.
5. Ros E. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1649S-56S.

6. Nepa. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO. Campinas: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP; 2011 [cited 2018 Mar 12]. Available from: <http://www.nepa.unicamp.br/taco/tabela.php?ativo=tabela>
7. Maranhão PA, Kraemer-Aguiar LG, de Oliveira CL, Kuschnir MC, Vieira YR, Souza MG, et al. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Nutr Metab (London)* 2011;8:32.
8. López-Uriarte P, Nogués R, Saez G, Bulló M, Romeu M, Masana L, et al. Effect of nut consumption on oxidative stress and the endothelial function in metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2010;29:373-80.
9. Cominetti C, de Bortoli MC, Garrido AB Jr, Cozzolino SM. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. *Nutr Res* 2012;32:403-7.
10. Colpo E, Dalton D A Vilanova C, Reetz LG, Duarte MM, Farias IL, Meinerz DF, et al. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. *Nutrition* 2014;30:459-65.
11. Colpo E, Vilanova CD, Brenner Reetz LG, Medeiros Frescura Duarte MM, Farias IL, Irineu Muller E, et al. A single consumption of high amounts of the Brazil nuts improves lipid profile of healthy volunteers. *J Nutr Metab* 2013;2013:653185. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/653185>
12. Ip C, Lisk DJ. Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. *Nutr Cancer* 1994;21:203-12.
13. Ip C, Lisk DJ. Characterization of tissue selenium profiles and anticarcinogenic responses in rats fed natural sources of selenium-rich products. *Carcinogenesis* 1994;15:573-6.
14. Pereira BJ, Castro I, Burdmann EA, Malheiros DM, Yu L. Effects of sirolimus alone or in combination with cyclosporine A on renal ischemia/reperfusion injury Braz J Med Biol Res 2010;43:737-44.
15. Facio Jr FN, Sena AA, Araújo LP, Mendes GE, Castro I, Luz MA, et al. Annexin 1 mimetic peptide protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Mol Med (Berl)* 2011;89:51-63.
16. Percario S, Vital ACC, Jablonka F. Dosagem do Malondialdeído. *Newslab* 1994;2:46-50.
17. Percario S. Avaliação laboratorial dos radicais livres. In: Olzewe E, ed. *Tratado de Medicina Ortomolecular e Bioquímica Médica*. São Paulo: Icone; 2002. p. 293-309.
18. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* 1993;84:407-12.
19. Coimbra TM, Janssen U, Gröne HJ, Ostendorf T, Kunter U, Schmidt H, et al. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney Int*. 2000;57:167-82.
20. Carlos CP, Mendes GEF, Miquelin AR, Luz MA, da Silva CG, van Rooijen N, et al. Macrophage depletion attenuates chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Transplantation* 2010;89:1362-70.
21. Versteilen AM, Blaauw N, Di Maggio F, Groeneveld AB, Sipkema P, Musters RJ, et al. ρ -Kinase inhibition reduces early microvascular leukocyte accumulation in the rat kidney following ischemia-reperfusion injury: roles of nitric oxide and blood flow. *Nephron Exp Nephrol* 2011;118:e79-86.
22. Wan X, Huang WJ, Chen W, Xie HG, Wei P, Chen X, et al. IL-10 deficiency increases renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol* 2014;128:37-45.
23. Robertson LT, Treviño-Villarreal JH, Mejia P, Grondin Y, Harputlugil E, Hine C, et al. Protein and Calorie Restriction Contribute Additively to Protection from Renal Ischemia Reperfusion Injury Partly via Leptin Reduction in Male Mice. *J Nutr* 2015;145:1717-27.
24. Yuan X, Lee JW, Bowser JL, Neudecker V, Sridhar S, Eltzschig HK. Targeting Hypoxia Signaling for Perioperative Organ Injury. *Anesth Analg* 2018;126:308-21.
25. Gholampour H, Moezi L, Shafaroodi H. Aripiprazole prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats, probably through nitric oxide involvement. *Eur J Pharmacol* 2017;813:17-23.
26. Le Meur Y, Leprivey-Logeot V, Mons S, José M, Dantal J, Lemauff B, et al. Serum levels of macrophage colony stimulating factor (M-CSF): A marker of kidney allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1862-5.
27. Wyburn KR, Jose MD, Wu H, Atkins RC, Chadban SJ. The role of macrophages in allograft rejection. *Transplantation* 2005;80:1641-7.
28. Jo SK, Sung SA, Cho WY, Go KJ, Kim HK. Macrophage contributes to the initiation of ischemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1231-9.
29. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 2008;118:3522-30.
30. Burdmann EA, Bennett WM. Nephrotoxicity of calcineurin and mTOR inhibitors. In: De Broe MF, Porter GA, Bennett WM, eds. *Clinical Nephrotoxins - Renal Injury from Drugs and Chemicals*. New York: Springer; 2008. p. 403-71.
31. Lloberas N, Torras J, Alperovich G, Cruzado JM, Giménez-Bonafé P, Herrero-Fresneda I, et al. Different renal toxicity profiles in the association of cyclosporine and tacrolimus with sirolimus in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:3111-9.
32. Stockler-Pinto MB, Mafrá D, Moraes C, Lobo J, Boaventura GT, Farage NE, et al. Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) improves oxidative stress and inflammation biomarkers in hemodialysis patients. *Biol Trace Elem Res* 2014;158:105-12.
33. Stockler-Pinto MB, Malm O, Moraes C, Farage NE, Silva WS, Cozzolino SM, et al. A follow-up study of the chronic kidney disease patients treated with Brazil nut: focus on inflammation and oxidative stress. *Biol Trace Elem Res* 2015;163:67-72.
34. Cardozo LF, Stockler-Pinto MB, Mafrá D. Brazil nut consumption modulates Nrf2 expression in hemodialysis patients: A pilot study. *Mol Nutr Food Res* 2016;60:1719-24.
35. Zhang T, Ma Y, Xu K, Huang W. Pretreatment of parecoxib attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *BMC Anesthesiol* 2015;15:165.
36. Zahmatkesh M, Kadkhodae M, Arab HA, Shams S. Effects of co-administration of an iNOS inhibitor with a broad-spectrum reactive species scavenger in rat renal ischemia/reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol* 2006;103:e119-25.
37. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
38. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315-424.
39. Navarro-Antolín J, Redondo-Horcajo M, Zaragoza C, Alvarez-Barrientos A, Fernández AP, León-Gómez E, et al. Role of peroxynitrite in endothelial damage mediated by Cyclosporine A. *Free Radic Biol Med* 2007;42:394-403.
40. de Jesus Soares T, Volpini RA, Francescato HD, Costa RS, da Silva CG, Coimbra TM. Effects of resveratrol on glycerol-induced renal injury. *Life Sci* 2007;81:647-56.
41. Amudha G, Josephine A, Sudhakar V, Varalakshmi P. Productive effect of lipoic acid on oxidative and peroxidative damage in cyclosporine A-induced renal toxicity. *Int Immunopharmacol* 2007;7:1442-9.
42. Armitage ME, Winkler K, Schmidt HH, La M. Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS. *J Mol Med (Berl)* 2009;87:1071-6.
43. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int* 2002;61:855-61.
44. Langston C. Managing Fluid and Electrolyte Disorders in Kidney Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2017;47:471-90.
45. Shah SR, Tunio SA, Arshad MH, Moazzam Z, Noorani K, Feroze AM, et al. Acute Kidney Injury Recognition and Management: A Review of the Literature and Current Evidence. *Glob J Health Sci* 2015;8:120-4.