

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

GABRIELLE POLTOZI VARGAS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE RICO EM ÁCIDO GRAXO
POLI-INSATURADO ÔMEGA 3 NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E OXIDATIVA DE
RINS SUBMETIDOS À ISQUEMIA FRIA E REPERFUSÃO – ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS**

*(Effect of supplementation with fish oil rich in polyunsaturated fatty acid omega 3 in
histological and oxidative evaluation of kidney submitted to cold ischemia and
reperfusion - experimental study in rats)*

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2014

GABRIELLE POLTOZI VARGAS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE RICO EM ÁCIDO GRAXO
POLI-INSATURADO ÔMEGA 3 NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E OXIDATIVA DE
RINS SUBMETIDOS À ISQUEMIA FRIA E REPERFUSÃO – ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS**

*(Effect of supplementation with fish oil rich in polyunsaturated fatty acid omega 3 in
histological and oxidative evaluation of kidney submitted to cold ischemia and
reperfusion - experimental study in rats)*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof^a Dr^a Cláudia Turra Pimpão
Coorientador: Prof^a Dr^a Juliany Gomes Quitzan

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2014



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus São José dos Pinhais

**ATA Nº 0048 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA GABRIELLE POLTOZI
VARGAS**

Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e quatorze, às 9:30 horas, realizou-se na sala de projeção 01, 1º andar, Bloco 01, Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa da Dissertação da mestranda Gabrielle Poltozi Vargas, intitulada: **"EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE RICO EM ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA 3 NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E OXIDATIVA DE RINS SUBMETIDOS À ISQUEMIA FRIA E REPERFUSÃO – ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS"**. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pela Professora orientadora e Presidente da banca, Dra. Claudia Turra Pimpão (PUCPR), auxiliada pelos Professores Doutores Fernando Meyer (PUCPR) e Ana Laura Angeli (UTP). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada APROVADA.

Profa. Dra. Claudia Turra Pimpão (Presidente)

Assinatura [assinatura]

Prof. Dr. Fernando Meyer (PUCPR)

Assinatura [assinatura]

Profa. Dra. Ana Laura Angeli (UTP)

Assinatura [assinatura]

Proclamado o resultado, a Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

São José dos Pinhais, 24 de fevereiro de 2014.

[assinatura]

Profa. Dra. Cristina Santos Sotomaior
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

[assinatura]

Caroline Nocera Bertton
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS.....	vii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	viii
RESUMO GERAL.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
LISTA DE QUADROS E FIGURAS.....	xiii
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA 3.....	3
2.2 ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA 3 E A DOENÇA RENAL...	6
2.3 ISQUEMIA E REPERFUSÃO NO TRANSPLANTE RENAL.....	8
2.3.1 Isquemia renal – lesão endotelial.....	9
2.3.2 Isquemia renal – lesão epitelial.....	11
2.3.3 Reperfusão renal.....	14
2.3.3.1 Estresse oxidativo e a peroxidação lipídica.....	16
2.4 ALTERAÇÕES TISSULARES À HISTOPATOLOGIA.....	18
CAPÍTULO 3	
3 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE RICO EM ÁCIDO GRÁXO POLI-INSATURADO ÔMEGA 3 NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E OXIDATIVA DE RINS SUBMETIDOS À ISQUEMIA FRIA E REPERFUSÃO – ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.....	20
Resumo.....	20
Abstract.....	21
3.1 INTRODUÇÃO.....	21
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.2.1 Animais.....	23

3.2.2 Óleo de peixe.....	23
3.2.3 Procedimento cirúrgico.....	24
3.2.4 Eutanásia dos animais.....	27
3.2.5 Estudo do estresse oxidativo renal.....	27
3.2.5.1 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px – EC 1.11.1.9).....	27
3.2.5.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1).....	28
3.2.5.3 Determinação da atividade da catalase (EC 1.11.1.6).....	28
3.2.6 Análise histopatológica.....	28
3.2.7 Análise estatística.....	29
3.3 RESULTADOS.....	29
3.4 DISCUSSÃO.....	32
3.5 CONCLUSÃO.....	38
CAPÍTULO 4	
4 CONCLUSÃO GERAL.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICE A - TABULAÇÃO DOS ESCORES DE LESÃO HISTOPATOLÓGICA TUBULAR NOS GRUPOS G2 E G3.....	53
APÊNDICE B – VALORES DE CATALASE EM $\mu\text{mol/g}$ TECIDO NOS GRUPOS: CONTROLE, SUPLEMENTADOS E NÃO SUPLEMENTADOS..	55
APÊNDICE C – VALORES DE GLUTATIONA PEROXIDASE EM nmol/mg DE TECIDO NOS GRUPOS: CONTROLE, SUPLEMENTADOS E NÃO SUPLEMENTADOS.....	56
APÊNDICE D – VALORES DE SUPERÓXIDO DISMUTASE EM nmol/mg DE TECIDO NOS GRUPOS: CONTROLE, SUPLEMENTADOS E NÃO SUPLEMENTADOS.....	57
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA PESQUISA.....	58
ANEXO B - COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE UTILIZADO NO ESTUDO.....	60

Dedico este trabalho aos meus pais, Ivan e Fátima, e ao meu esposo Inácio. Vocês tem sido o vento que impulsiona minhas asas.
A vocês cada gota de suor e lágrima.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar presente em cada minuto de minha vida.

Agradeço a todas as pessoas que durante esses anos contribuíram, doando um pouco de si, para tornar este trabalho possível.

Em especial à:

- Pontifícia Universidade Católica do Paraná – pela oportunidade e incentivo à pesquisa.

- Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP – Botucatu – pelas instalações e equipamentos cedidos para o procedimento cirúrgico.

- UNIPEX – pelo alojamento onde os animais foram mantidos.

- Prof^a Dr^a Juliany Gomes Quitzan – pelos ensinamentos, pela confiança e por permanecer neste projeto mesmo tendo mudado de instituição.

- Prof^a Dr^a Cláudia Turra Pimpão – pelas orientações e pelo voto de confiança ao assumir este projeto.

- Prof Dr Paulo Roberto Kawano – pela colaboração no desenvolvimento das cirurgias e orientações.

- Prof Dr Fernando Meyer – pela colaboração no delineamento deste projeto.

- Prof^a Dr^a Cristina Sotomaior – pela paciência, apoio e confiança neste projeto.

- Prof Dr Flavio de Oliveira Lima – pela colaboração na avaliação histopatológica.

- Prof Dr^a Ana Angélica Henrique Fernandes – pela colaboração e orientações na avaliação das enzimas do estresse oxidativo.

- Mestranda Patrícia Mosko – pelo apoio, amizade e exemplo.

- Secretária Caroline Nocera Bertton – pela ajuda em todos os momentos do mestrado, apoio e confiança.

- Alunas: Rebeca, Tuany, Bruna e Letícia – pela colaboração no cuidado com os animais.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral dos objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura.

O capítulo 3 é um artigo em estágio de redação para a publicação em periódico científico ainda a ser selecionado.

O Capítulo 4 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

A lesão renal por isquemia fria e os danos causados pela reperfusão continuam sendo um desafio no procedimento de transplante renal, devido ao risco de ocorrência de lesões morfofuncionais momentâneas ou permanentes no órgão. Os benefícios dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 são estudados em diversas doenças de caráter agudo e crônico, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antifibróticas, vasodilatadoras e antitrombogênicas. Neste estudo, objetivou-se comparar o estresse oxidativo e as alterações histopatológicas em rins de ratos Wistar submetidos à isquemia fria seguida de reperfusão em animais suplementados previamente por 30 dias com óleo de peixe rico em ômega 3 e animais não suplementados. Os animais foram submetidos à perfusão fria *in situ* por 15 minutos e reperfusão de 1 hora. Na avaliação do estresse oxidativo renal, os valores de superóxido dismutase ($p < 0,001$), catalase ($p < 0,05$) e glutathiona peroxidase ($p < 0,05$) encontraram-se diminuídos no grupo tratado em relação ao não tratado. Na histopatologia, observou-se que as lesões encontradas foram similares em todos os rins dos grupos submetidos à isquemia fria, independente da suplementação. Conclui-se neste estudo que o uso de óleo de peixe rico em ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 não conferiu nefroproteção ao insulto de isquemia fria e reperfusão *in situ*.

Palavras-chave: Nutracêutico. Transplante renal. Perfusão *in situ*. Estresse oxidativo. Histopatologia.

ABSTRACT

Renal injury due to cold ischemia and reperfusion damage remains a persistent problem in renal transplant procedure. It causes temporary or permanent morphological and functional lesions in the organ. Benefits of polyunsaturated omega 3 fatty acids has been studied in several diseases of acute and chronic character, due to its anti-inflammatory, antioxidant, antifibrotic, vessel dilator and antithrombogenic properties. The objective of this study was to compare the oxidative stress and histopathological alterations in kidneys of Wistar rats submitted to cold ischemia followed by reperfusion in animals pretreated for 30 days with fish oil rich in omega 3 and non-supplemented animals. The animals were subjected to *in situ* cold perfusion for 15 minutes and reperfusion for 1 hour. In the evaluation of renal oxidative stress, the values of superoxide dismutase ($p < 0.001$), catalase ($p < 0.05$) and glutathione peroxidase ($p < 0.05$) were decreased in the treated group, compared to the untreated. Histopathology revealed that the lesions were very similar in all groups of kidneys subjected to cold ischemia, regardless of group (treated or not). It is concluded that the use of fish oil rich in polyunsaturated omega 3 fatty acids did not confer nephroprotection insult cold ischemia and reperfusion *in situ*.

Keywords: Nutraceutical. Kidney transplantation. *In situ* perfusion. Oxidative stress. Histopathology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	<i>Arachidonic acid</i> – Ácido Araquidônico
AGPI	Ácido Graxo Poli-insaturado
ATP	Adenosina trifosfato
COX	Ciclo-oxigenase
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i> – Ácido Docosahexaenoico
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i> – Fatores de relaxamento derivados do endotélio
EDCF	<i>Endothelium-derived contracting factor</i> – Fatores de contração derivados do endotélio
EPA	<i>Eicosapentaenoic acid</i> – Ácido Eicosapentaenoico
ERK	<i>Signal regulated kinase</i> – Sinal regulado por kinase
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
GSH	Glutaciona reduzida
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSSG	Glutaciona oxidada
HE	Hematoxilina-eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HPEPE	Ácido hidroxieicosapentaenoico
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
IL	Interleucina
IRA	Insuficiência Renal Aguda
I/R	Isquemia e reperfusão
L·	Radical lipídico
LOX	Lipo-oxigenase
LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	<i>Nitric oxide</i> – Óxido nítrico

OH ⁻	Radicais livres de hidroxila
PG	Prostaglandina
pH	Potencial Hidrogeniônico
SOD	<i>Superoxide dismutase</i> – Superóxido dismutase
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> – Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano
xg	Força centrífuga relativa (RCF)
°C	Graus Celsius

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

	Página
Quadro 1. Medianas dos escores correspondentes a cada critério avaliado nos grupos suplementados (G3) e não suplementados (G2).....	29
Figura 1. Representação esquemática da estrutura química dos principais ácidos graxos monoinsaturados representados em a (ômega 9) e poli-insaturados representados por b (ômega 6) e c (ômega 3).	4
Figura 2. Representação esquemática da ação das enzimas ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases sobre o ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA) na formação de eicosanoides.....	6
Figura 3. Representação esquemática da degradação dos radicais superóxido pela enzima superóxido dismutase.....	15
Figura 4. Representação esquemática das etapas de iniciação, propagação e terminação da peroxidação lipídica.....	18
Figura 5. Clampeamento da artéria aorta abdominal (seta cheia) e veia cava caudal (seta pontilhada) cranialmente à artéria mesentérica (A); e caudalmente de forma agrupada (ponta de seta) (B).....	25
Figura 6. Perfusão renal <i>in situ</i> com inserção de cateter 22 G na Artéria Mesentérica (ponta de seta) e presença de pontos de isquemia (asterisco).....	26
Figura 7. Rins visivelmente pálidos ao término da infusão vascular fria.....	26
Figura 8. Fotomicrografia de rins de ratos Wistar submetidos à isquemia fria e reperfusão, com suplementação de ômega 3. A - Acúmulo de material eosinofílico na luz tubular (seta cheia) (HE / 20x). B – Necrose tubular aguda (seta pontilhada) (HE / 40x).....	30
Figura 9. Fotomicrografia de rins de ratos Wistar submetidos à isquemia fria e reperfusão, com suplementação de ômega 3. A - Congestão (seta pontilhada) (HE / 40x). B – Vacuolização das células tubulares (seta cheia) (HE / 20x).....	30

- Figura 10. Concentração renal (nmol/mg) da enzima superóxido dismutase no grupo controle (G1) e nos grupos submetidos à isquemia renal fria e reperfusão, suplementados (G3) e não suplementados com AGPI ômega 3. Letras diferentes $p < 0,001$. As barras representam média e desvio padrão..... 31
- Figura 11. Concentração renal (nmol/mg) da enzima glutathiona peroxidase no grupo controle (G1), e nos grupos submetidos à isquemia renal fria e reperfusão, suplementados (G3) e não suplementados (G2) com AGPI ômega 3. Letras diferentes $p < 0,05$. As barras representam média e desvio padrão..... 32
- Figura 12. Concentração renal ($\mu\text{mol/g}$) da enzima catalase no grupo controle (G1), e nos grupos submetidos à isquemia renal fria e reperfusão, suplementados (G3) e não suplementados (G2) com AGPI ômega 3. Letras diferentes $p < 0,05$. As barras representam média e desvio padrão..... 32

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

No transplante renal, o órgão a ser transplantado sofre uma série de danos celulares e moleculares, como resultado da isquemia durante a captação e manutenção, até seu efetivo implante no receptor, com conseqüente reperfusão. Estes eventos geram diversas agressões ao enxerto que são conhecidas coletivamente como injúria de isquemia e reperfusão (Baker et al., 1985; Bonventre, 1993; Peres et al., 2005; Kosieradzki e Rowinski, 2008).

Inicialmente, a necrose tubular aguda surge como resultado da desorganização dos mecanismos de sinalização celular e comprometimento estrutural causado pela isquemia renal. O restabelecimento do fluxo sanguíneo ao órgão, ainda que rápido, pode não ser suficiente para restabelecer de imediato a filtração glomerular. Isto porque a reperfusão pode perpetuar, ou ainda agravar a lesão original devido a geração de radicais livres e/ou por causar modificações no meio intracelular, com alterações do cálcio citosólico e pH (Baker et al., 1985; Devarajan, 2006; Kosieradzki e Rowinski, 2008; Kumar, 2012), além da ativação de células inflamatórias (Bonventre e Zuk, 2004; Francischetti et al., 2010).

Em tecidos pós-isquêmicos, os radicais livres produzidos são originados de diversas fontes (Baker et al., 1985; Bonventre, 1993; Mitchell et al., 2010) e sua produção é limitada por sistemas antioxidantes, que os mantêm em equilíbrio. Quando há desequilíbrio entre a sua produção e a capacidade antioxidante do organismo surge o estresse oxidativo (Pagliuso et al., 2006), responsável por causar inativação ou mutação do DNA e oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (peroxidação lipídica) (Ferreira e Matsubara, 1997; Pagliuso et al., 2006).

Com objetivo de aumentar os índices de sucesso do transplante renal, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos acerca de fatores que influenciem na qualidade da preservação do enxerto (Rhoden et al., 2002; Treckmann et al., 2009; Regner et al., 2010; Yurdakul et al., 2010; Bon et al., 2012). Assim, o uso de terapias que limitem a ativação de células inflamatórias e o dano tecidual causado por radicais livres podem diminuir os

eventos desencadeados pela isquemia/reperfusão e prevenir lesões renais. Evidências científicas mostram que a suplementação de ácido graxo poli-insaturado ômega 3 apresenta ação anti-inflamatória e nefroprotetora, tanto em processos agudos quanto em processos crônicos (Hassan e Gronert, 2009).

Outros autores comprovaram ainda que uma dieta rica em antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 aumenta os níveis de ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) concomitante à redução na incorporação de ácido araquidônico nas membranas celulares renais, diminuindo o substrato para produção de mediadores inflamatórios (Clark et al., 1991). Há ainda, ação inibitória na produção de eicosanoides e citocinas pró-inflamatórias, minimizando assim, lesões decorrentes de uma resposta inflamatória exacerbada (Waitzberg, 2009).

Uma grande metanálise conduzida em 2005 por Tatsioni et al. avaliou 16 publicações com um total de 812 pacientes que realizaram transplante renal e receberam óleo de peixe no pós-operatório. Nessa revisão, os autores concluíram que os estudos envolvendo administração de ômega 3 no paciente receptor renal são ainda insuficientes e discordantes.

Desta forma, como não existem relatos na literatura sobre o uso de ômega 3 em doadores vivos e paciente pré-transplante renal, este estudo teve por objetivo avaliar as consequências histológicas e oxidativas da perfusão renal fria e reperfusão em ratos Wistar, suplementados ou não com óleo de peixe rico em ácido graxo poli-insaturado ômega 3 (AGPI n-3).

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA 3

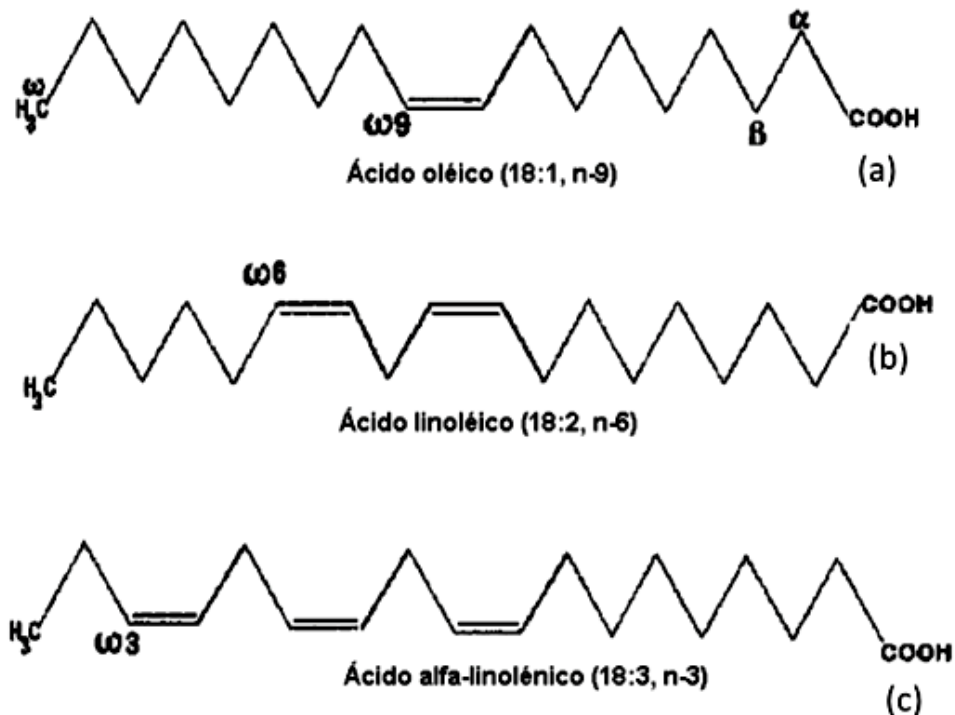
Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias longas de hidrocarbonetos. Sua classificação é dada de acordo com a presença de duplas ligações: não saturadas e saturadas. Os ácidos graxos que apresentam apenas uma dupla ligação em sua composição são denominados de monoinsaturados, enquanto os que apresentam duas ou mais duplas ligações são chamados de poli-insaturados (Aikawa, 2004).

Quanto à nomenclatura, as famílias dos ácidos graxos são classificadas conforme a posição da primeira dupla ligação a partir do radical metila e as mais importantes são as famílias ômega 3 (n-3), ômega 6 (n-6) e ômega 9 (n-9) (figura 1). A família n-6 é derivada do ácido linoleico e a família n-3 deriva-se do ácido alfa-linolênico. Em plantas, estas duas famílias podem ser convertidas uma na outra pela ação de enzimas. Como isto não ocorre em mamíferos, há necessidade da ingestão destes ácidos graxos pela dieta e, por este motivo então, são considerados ácidos graxos poli-insaturados essenciais (Aikawa, 2004; Martin et al., 2006).

Os ácidos graxos essenciais, depois de ingeridos, passam por uma série de reações bioquímicas na presença das enzimas alongase e dessaturase. (Martin et al., 2006). A partir dessas reações, o ácido linoleico irá originar o ácido araquidônico (AA), enquanto o ácido alfa-linolênico dará origem ao ácido eicosapentaenoico (EPA), ambos ácidos graxos com 20 carbonos em sua composição química, que formam os fosfolípidos das membranas biológicas. O ácido alfa-linolênico é também precursor do ácido docosahexaenoico (DHA) (Aikawa, 2004; Moraes e Colla, 2006; Waitzberg, 2009).

Os ácidos graxos linoleico e alfa-linolênico são substratos das mesmas dessaturases; portanto, as famílias n-3 e n-6 competem pelas mesmas enzimas na via metabólica, sendo que a maior afinidade ocorre em n-3. Deste modo, uma dieta rica em ácidos graxos ômega 3 é capaz de aumentar o nível de EPA e DHA, reduzindo a conversão de ácido linoleico em ácido araquidônico (Aikawa, 2004).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura química dos principais ácidos graxos monoinsaturados representados em **a** (ômega 9) e poli-insaturados representados por **b** (ômega 6) e **c** (ômega 3).



Fonte: Aikawa, 2004.

O ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA) são precursores de eicosanoides que atuam como moduladores químicos em diversos processos biológicos, como na resposta inflamatória, agregação plaquetária, permeabilidade vascular e na formação de interleucinas. Os principais eicosanoides compreendem as prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT), lipoxinas (LX) e os ácidos epoxieicosatrienoicos (Aikawa, 2004; Waitzberg, 2009; Gomes e Oliveira, 2010).

As famílias de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 originam séries diferentes de eicosanoides. A partir do metabolismo do AA, a ciclo-oxigenase (COX) gera prostaglandinas e tromboxanos da série 2, enquanto que do metabolismo do EPA, a mesma enzima é capaz de induzir a formação dos mesmos eicosanoides, porém da série 3. Existem duas isoformas de COX: a COX-1 (enzima constitutiva) e a COX-2 (enzima induzível). Estudos publicados a partir do ano 2000 levantaram a hipótese de uma terceira isoforma, chamada COX-3, envolvida na produção de resolvinas, mediadores lipídicos que atuam no processo inflamatório (Aikawa, 2004; Berenbaum, 2004).

A 5-lipo-oxigenase (5-LOX) é outra enzima que também está relacionada com a formação de eicosanoides, originando os leucotrienos. Esta, quando atua sobre o AA, induz a formação de leucotrienos da série 4 e 5-HPETE; já quando age sobre EPA, gera 5-HPEPE e desencadeia a produção de leucotrienos da série 5 (figura 2) (Simopoulos, 2002; Aikawa, 2004; López-Novoa, 2006).

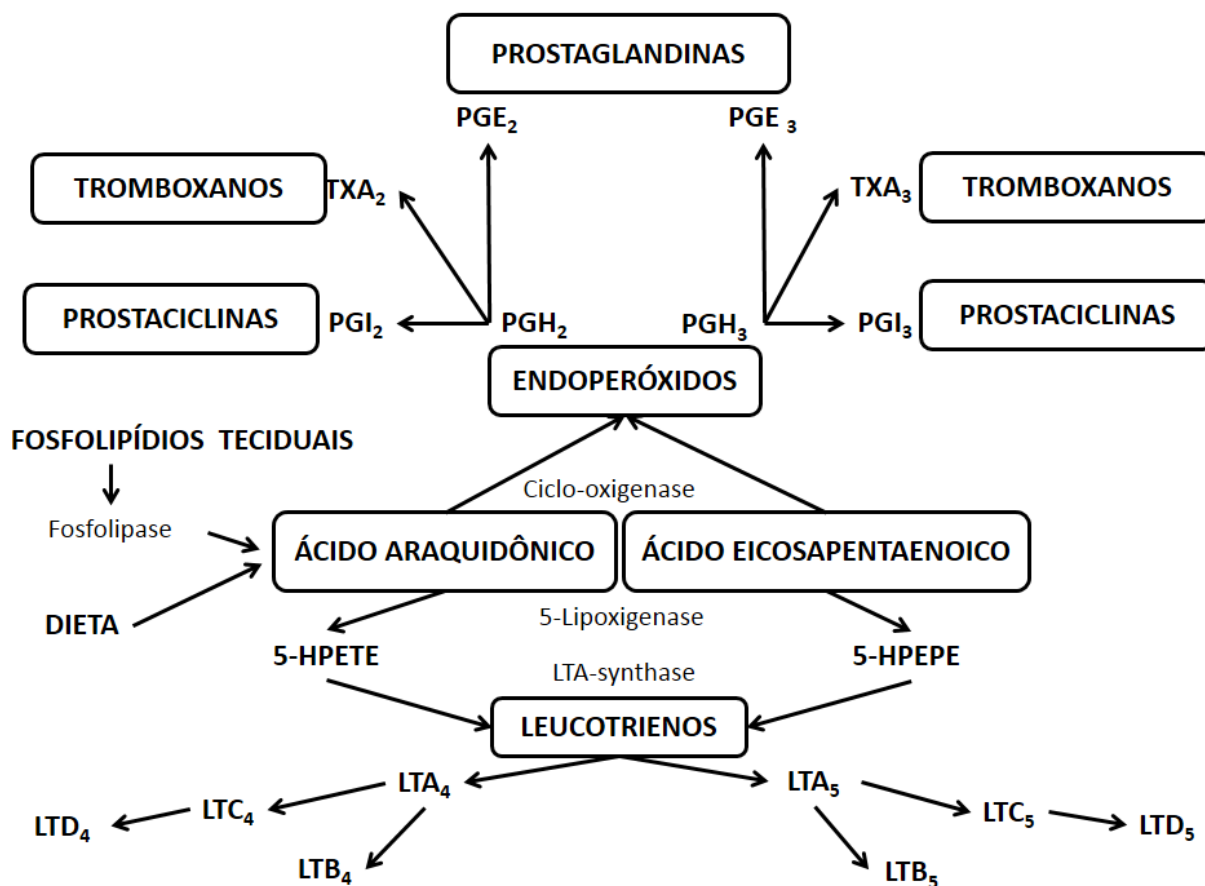
Ao competir com o ácido graxo n-6 pelas mesmas enzimas no processo de formação dos eicosanoides, o ácido graxo n-3 antagoniza a produção de eicosanoides derivados do metabolismo do ácido linoleico, constituindo um ponto chave anti-inflamatório. Desta forma, os ácidos graxos poli-insaturados da família n-3, especialmente EPA e DHA possuem importante papel na modulação inflamatória, pois podem modificar a resposta imunitária, inibindo também a produção de citocinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de interleucinas IL-1 e IL-6 por monócitos. (Robinson et al., 1996; Simopoulos, 2002; Waitzberg, 2009).

Matsumoto et al. (2009) em estudo avaliando artéria mesentérica isolada de ratos com diabetes tipo 2, comprovaram que, após 4 semanas de administração de ácido eicosapentaenoico na dose de 300mg/Kg/dia, as artérias analisadas demonstravam melhor contração. Segundo o estudo, o ácido graxo n-3 EPA normalizou o metabolismo do óxido nítrico (NO), reduziu os fatores de contração derivados do endotélio (EDCF), expressão de COX-2, a ativação de fator nuclear-kB e a inibição da ERK (signal regulated kinase), além de suprimir a produção de prostanoídes.

Existem estudos que comprovam a ação moduladora sobre os lipídios e a pressão sanguínea, demonstrando que o ácido graxo poli-insaturado ômega 3 tem a capacidade de reduzir a pressão arterial, assim como os níveis de colesterol e triglicerídeos (Neumayer et al., 1992; Liu et al., 2011).

Adicionalmente, um importante efeito quando se trata de situações isquêmicas é o feito antitrombogênico. A suplementação do ômega 3 (DHA) reduziu significativamente a agregação de colágeno e liberação de TXB₂, inibindo a função plaquetária, conforme demonstrado por Woodman et al (2003) em pacientes diabéticos tipo 2. Comparando-se a administração de DHA e EPA, o estudo sugere ainda, que o DHA pode ser um agente antitrombogênico mais efetivo que o EPA.

Figura 2 - Representação esquemática da ação das enzimas ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases sobre o ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA) na formação de eicosanoides.



Fonte: Simopoulos, 2002.

Os AGPI n-3 têm sido também empregados na terapia de combate ao estresse oxidativo em diversas outras doenças crônicas e de caráter degenerativo como depressão, mal de Alzheimer, artrite, neoplasias, cardiopatias, entre outras (Simopoulos, 2002; Moraes e Colla, 2006).

2.2 ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA 3 E A DOENÇA RENAL

Nos rins, existem três principais vias do metabolismo do ácido araquidônico: a via das ciclo-oxigenases (formação de prostaglandinas e tromboxanos), a via das lipo-oxigenases (que leva a formação de ácido eicosatetraenoico e leucotrienos) e, a via do citocromo P-450 (formação de ácido epoxieicosatrienoico, ácido eicosatetraenoico e

derivados mono-oxigenados do ácido araquidônico) (Fernandez et al., 2004; Gomes e Oliveira, 2010).

O sistema enzimático das ciclo-oxigenases é a principal via do ácido araquidônico presente no rim. Seus produtos modulam a ação fisiológica de outros hormônios com atuação no tônus vascular renal, função glomerular, função mesangial e na homeostase de sal e água. Os produtos da via das ciclo-oxigenases também estão listados como mediadores de alterações funcionais renais em muitas doenças glomerulares, insuficiência renal aguda (IRA), doença renal crônica, nefrotoxicidade à ciclosporina, síndrome hepatorenal, nefropatia diabética, hipertensão de origem renal e rejeição de transplantes (Fernandez et al., 2004; López-Novoa, 2006).

Sabe-se que a via comum das lesões renais envolve inflamação e fibrose; deste modo, justifica-se o fato de estar em destaque no meio científico terapias que possam reduzir a resposta inflamatória, como o uso de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3. Extrapolando a investigação experimental, ensaios clínicos envolvendo pacientes diagnosticados com nefropatias imunomediadas, nefrite por lúpus, doença renal policística, e outras doenças glomerulares mostraram efeitos benéficos com o uso do ômega 3 (Fassett et al., 2010).

Uma vez que o consumo de n-3 tem sido relacionado a um incremento de EPA e DHA com recíproca queda nos níveis de n-6 na composição da membrana plasmática (Clark et al., 1991), sugere-se que há uma competição evidente entre ômega 3 exógeno e ômega 6. O efeito positivo advém do fato de que o ácido linoleico (n-6), quando convertido a ácido araquidônico tem funções pró-inflamatórias, estando envolvido na inflamação, geração de radicais livres, proliferação e estimulação da matriz extracelular (An et al., 2009).

Um estudo desenvolvido por Clark et al. (1991) demonstrou que a suplementação de ômega 3 e antioxidantes diminuiu significativamente a incorporação de ácido araquidônico no tecido renal, com redução da glomerulosclerose e infiltração de macrófagos em ratos submetidos à nefrectomia de 5/6.

Hassan e Gronert (2009) demonstraram o efeito nefroprotetor do ômega 3 quando submeteram ratos à isquemia quente por 30 e 45 minutos, administrando ômega 3 e 6 no pós-operatório imediato. Nos animais tratados com ômega 6, houve aumento nos

níveis de creatinina, enquanto que os animais tratados com ômega 3 mantiveram a função renal. O grupo que sofreu isquemia por 45 minutos e suplementação com ômega 6 teve 100% de mortalidade; contrastando com 100% de sobrevivência no grupo suplementado com ômega 3.

Outros mecanismos atribuídos ao uso terapêutico do ácido graxo poli-insaturado ômega 3 (AGPI n-3) na doença renal incluem: (1) aumento da circulação de eicosanoides da série ímpar (séries 3 e 5), os quais têm ação anti-inflamatória, antitrombótica e inibem a agregação plaquetária; (2) aumento da produção endotelial de fatores de relaxamento (EDRF); (3) aumento de TGF-beta, uma potente citocina imunomodulatória que atua reduzindo a ativação de linfócitos T, limitando, portanto, a resposta inflamatória; (4) possui efeito hipotensivo, alterando a pressão arterial sistêmica; (5) ação hipotrigliceridemiante e; (6) reduz a agregação plaquetária, resultando em aumento do tempo de sangramento, o que melhoraria a fibrinólise (Lauretani et al., 2009).

An et al. (2009) demonstraram ainda que há uma redução da atividade pró-inflamatória, pró-oxidante e pró-fibrótica, com diminuição da lesão tubulointersticial em rins de ratos suplementados com n-3 e submetidos à exérese 5/6.

2.3 ISQUEMIA E REPERFUSÃO NO TRANSPLANTE RENAL

No decorrer dos processos que envolvem o transplante renal, o rim doado sofre uma sequência de agressões denominadas coletivamente como injúrias de isquemia e reperfusão (I/R). Esta continua sendo uma resultante inevitável, considerada porém indesejável e com importantes consequências clínicas (Salahudeen, 2004; Kosieradzki e Rowinski, 2008; Van der Vliet et al., 2011).

Embora a I/R represente um processo dinâmico e complexo, a mesma pode ser dividida em fases, tendo início com a interrupção do fluxo sanguíneo ao rim por meio do clampeamento dos vasos renais (isquemia quente). Posteriormente segue-se o período em que o rim a ser doado é perfundido com solução de preservação celular gelada e nela mantido (isquemia fria), avança pelo intervalo no qual o rim é removido da solução de preservação e anastomosado nos vasos do receptor e encerra-se quando os *clamps*

vasculares são removidos e o rim transplantado é então reperfundido (reperfusão) (Peres et al., 2005; Van der Vliet et al., 2011).

Após um breve período de isquemia quente, o rim de doador vivo é resfriado imediatamente através da perfusão com soluções geladas. Estas soluções de preservação a frio devem ser capazes de minimizar o edema celular causado pela hipotermia e isquemia, prevenir a acidose celular e o influxo de cálcio, evitar o dano celular por espécies reativas de oxigênio, fornecer substratos energéticos para a regeneração de ATP (trifosfato de adenosina) durante a reperfusão e ainda limitar a perda de íons intracelulares ('t Hart et al., 2002; Cobo e Gallegos, 2009).

Muito embora o enxerto sofra danos quando submetido a baixas temperaturas, o procedimento de perfusão hipotérmica é condição indispensável para viabilizar a sua preservação (Fuller, 1999; Bartels-Stringer et al., 2003; Lledo-Garcia et al., 2007). Isto porque a diminuição do metabolismo celular e conseqüente redução da velocidade das reações bioquímicas proporcionados pela hipotermia associam-se aos benefícios atribuídos às soluções, mantendo-o viável, ainda que em isquemia (Southard et al., 1980; 't Hart et al., 2002; Allam et al., 2010).

A isquemia renal é apontada como uma das principais causas de necrose tubular aguda. Atualmente sabe-se que as lesões decorrentes do período de isquemia são sustentadas e agravadas durante o período de reperfusão, promovendo lesões tissulares adicionais (Baker et al., 1985; Devarajan, 2006; Mitchell et al., 2010; Kumar, 2012).

2.3.1 Isquemia renal – lesão endotelial

O imediato resfriamento renal após a nefrectomia é a primeira linha de defesa contra a lesão isquêmica que se estabelece no rim do doador. A hipotermia clínica reduz o metabolismo celular; no entanto, a 4°C existem algumas taxas metabólicas remanescentes que acabam com os estoques de ATP. Com a interrupção do suprimento de oxigênio ao rim, a célula passa do metabolismo aeróbico para o anaeróbico, estabelecendo um desequilíbrio entre a contínua utilização do ATP e sua baixa produção pela via glicolítica (Fuller, 1999; Salahudeen, 2004; Guibert et al., 2011; Henry e Guarrera, 2012).

Assim como observado em rins submetidos à injúria de isquemia quente e reperfusão, intensa vasoconstrição e lesão endotelial são características marcantes da isquemia fria (Harvig et al., 1980; Brodsky et al., 2002; Sutton et al., 2002; Meyer et al., 2011). O endotélio vascular tem importante papel na regulação da migração de células inflamatórias para o tecido, manutenção do tônus vascular, perfusão, permeabilidade vascular e coagulação, sendo crucial para a função do rim transplantado a curto e longo prazo (Bonventre, 1993; Salahudeen, 2004; Sharfuddin e Molitoris, 2011).

Com a lesão isquêmica, as células endoteliais perdem a habilidade para regular de forma eficaz estas funções. Inicialmente, a lesão endotelial provoca alteração na produção local de substâncias vasoativas, podendo haver intensificação do processo de vasoconstrição devido ao aumento da produção de endotelina-1, angiotensina II, tromboxanos A₂, prostaglandinas H₂, leucotrienos C₄ e D₄ e adenosina, além da estimulação simpática, o que influencia os mecanismos de autorregulação e mantém o tufo capilar glomerular isquêmico. Há ainda redução da resposta de vasodilatação à ação da acetilcolina, bradicininas e ao óxido nítrico, perpetuando a vasoconstrição local e hipóxia (Brodsky et al., 2002; Sutton et al., 2002; Schlichting et al., 2006; Bonventre e Yang, 2011; Sharfuddin e Molitoris, 2011).

Alterações morfológicas das células vasculares podem ser observadas após a depleção de ATP, como a separação das junções endoteliais, perda da inserção de células endoteliais na membrana basal e morte celular. Estas alterações são potencialmente responsáveis pela alterada reatividade vascular, aumento da permeabilidade vascular, edema intersticial e alterada coagulação devido à perda da função normal e barreira endotelial (Brodsky et al., 2002; Sutton et al., 2002).

A depleção de ATP provoca lesão mitocondrial, aumentando a produção de citocinas inflamatórias, endotelina e de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando como resultado a adesão leucocitária no endotélio e a ativação de leucócitos, que são características da lesão renal isquêmica (Sutton et al., 2002; Bonventre e Zuk, 2004; Francischetti et al., 2010; Bonventre e Yang, 2011).

O dano das células endoteliais ativa moléculas de adesão que promovem interações leucócito-endoteliais, ativação dos leucócitos com formação de microtrombos e obstrução dos capilares e vênulas pós-capilares. Há, ainda, ruptura da monocamada

endotelial, com a migração leucocitária para o interstício, que se expande devido ao edema e ao grande número celular (Sutton et al., 2002; Bonventre e Zuk, 2004; Francischetti et al., 2010; Bonventre e Yang, 2011).

Os neutrófilos são as primeiras células a se acumularem no sítio da lesão isquêmica (Devarajan, 2006; Sharfuddin e Molitoris, 2011). Uma vez ativados, os neutrófilos produzem proteases, colagenases, elastases, mieloperoxidasas, espécies reativas de oxigênio e citocinas, que provocarão o aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia, redução da integridade endotelial e epitelial, amplificando a resposta inflamatória (Silveira e Yoshida, 2004; Francischetti et al., 2010).

A congestão da microcirculação renal que se desenvolve, especialmente nos capilares peritubulares da região medular externa (vasa recta) contribui para o déficit na perfusão renal. Dada a susceptibilidade à hipóxia da medular externa, a lesão isquêmica e edema das células endoteliais podem ser um mecanismo plausível na contribuição da congestão e lesões observadas nesta região (Harvig et al., 1980; Bonventre, 1993; Sutton et al., 2002).

A disfunção endotelial conduz ao dano de células não endoteliais localizadas nas margens dos capilares, o que tem aumentado o interesse pelo estudo nesse campo (Brodsky et al., 2002). Associadas, as lesões endoteliais que resultam no comprometimento da microcirculação provocam a redução da taxa de filtração glomerular e contribuem para o desenvolvimento da Insuficiência renal aguda (IRA) (Sutton et al., 2002; Devarajan, 2006; Bonventre e Yang, 2011).

2.3.2 Isquemia renal – lesão epitelial

Além do dano às células endoteliais, as células tubulares são consideradas o principal alvo de lesões decorrentes da isquemia e reperfusão. A lesão isquêmica é mais proeminente no terço distal do túbulo contornado proximal e no ramo ascendente espesso da alça de Henle devido às altas taxas metabólicas e necessidade de oxigênio. Visto que nesses segmentos as taxas metabólicas são constantes, com a interrupção do suprimento de oxigênio o metabolismo anaeróbico prevalece, sendo evidenciado um

aumento do lactato e fosfato inorgânico endocitoplasmático bem como diminuição do pH intracelular (Bonventre, 1993; Kosieradzki e Rowinski, 2008; Kumar, 2012).

Alterações importantes no citoesqueleto das células tubulares também são observadas devido à lesão isquêmica e ao choque térmico desenvolvido pela queda da temperatura (Devarajan, 2006; Henry e Guarrera, 2012). A depleção do ATP celular leva ao desarranjo do citoesqueleto com ruptura devido à redistribuição da actina para o citoplasma, resultando na perda de suas microvilosidades apicais (Devarajan, 2006; Sharfuddin e Molitoris, 2011).

A bomba sódio-potássio ATPase se desprende da membrana basolateral, onde é fixa por moléculas de actina ao citoesqueleto celular e é redistribuída na membrana apical. Esta redistribuição nas células do túbulo proximal provoca um aumento significativo na fração excretada de sódio que, percebido pela mácula densa leva à constrição da arteríola aferente, reduzindo a taxa de filtração glomerular (TFG) (Molitoris et al., 1991; Schrier et al., 2004; Sharfuddin e Molitoris, 2011; Kumar, 2012).

Com a localização errática da bomba Na-K-ATPase, as células perdem sua polaridade, que resulta na alteração da movimentação de solutos e edema celular. Sequencialmente, com a manutenção da depleção de ATP, há a paralisação da atividade das bombas iônicas transmembrana, dentre elas a Na-K-ATPase, contribuindo para a gênese do edema e provocando a morte celular (Molitoris et al., 1991; Bonventre, 1993; Padanilam, 2003; Kosieradzki e Rowinski, 2008).

No processo isquêmico ocorre ainda redistribuição das integrinas da membrana basal para a membrana apical das células tubulares. Estas integrinas são glicoproteínas responsáveis pela fixação celular na membrana basal, sem estas estruturas as células podem descamar com facilidade. Com a esfoliação celular e a localização das integrinas na membrana apical, as células tubulares podem aderir-se umas às outras, provocando obstrução tubular (Schrier et al., 2004; Devarajan, 2006; Sharfuddin e Molitoris, 2011; Kumar, 2012).

Como consequência do destacamento celular ocorre o desnudamento da membrana basal, permitindo o livre influxo do filtrado glomerular para o meio intersticial, o que reduz a taxa de filtração glomerular, provoca edema e compromete o fluxo

sanguíneo nos capilares adjacentes (Bonventre, 1993; Schrier et al., 2004; Bonventre e Yang, 2011).

Ainda, debris celulares formados por células viáveis descamadas da membrana basal, juntamente com células mortas e proteínas presentes no lúmen podem causar obstrução tubular pela formação de cilindros, aumentando a pressão intratubular e reduzindo a taxa de filtração glomerular do túbulo afetado (Bonventre e Yang, 2011; Sharfuddin e Molitoris, 2011).

A depleção de ATP gera um deficiente movimento de cálcio para dentro do retículo endoplasmático, bem como a uma diminuída extrusão para o espaço extracelular, que resulta no acúmulo intracelular deste íon (Devarajan, 2006; Guibert et al., 2011). O excesso de cálcio intracelular leva a sua captação exacerbada pelas mitocôndrias, prejudicando a fosforilação oxidativa ainda remanescente. O aumento citosólico de cálcio também pode ser nocivo à célula por estimular ATPases do retículo endoplasmático edemaciado; desta forma, o consumo de ATP ativa fosfolipases e proteases cálcio dependentes, que levam à proteólise, ruptura de membranas e comprometimento adicional ao citoesqueleto (Fuller, 1999; Knight e Nicholson, 2001; Padanilam, 2003; Kosieradzki e Rowinski, 2008).

Somando-se à contribuição de leucócitos e células endoteliais para a resposta inflamatória, o epitélio tubular renal também gera mediadores que potencializam a inflamação, como citocinas pró-inflamatórias e quimiotáticas (Bonventre e Zuk, 2004; Kumar, 2012).

Muitos inibidores inflamatórios endógenos têm por objetivo limitar o dano renal pós-isquêmico, como a heme-oxigenase-1, proteínas de Tamm-Horsfall, resolvinas e protectinas D-1. Estas duas últimas são derivadas do ácido docosahexaenoico (DHA) oriundo do ácido graxo poli-insaturado ômega 3. Estudos comprovam que a administração de resolvinas e protectina D-1 em ratos resulta na redução do acúmulo leucocitário e ativação de macrófagos, levando à redução das alterações morfofuncionais e da fibrose pós-isquêmica (Hassan e Gronert, 2009; Barbalho et al., 2011; Sharfuddin e Molitoris, 2011).

2.3.3 Reperusão renal

Depois de realizado o transplante renal, danos ainda maiores que aqueles desenvolvidos durante a isquemia fria são produzidos. A reperusão promove a circulação de espécies reativas de oxigênio formadas durante o período isquêmico e durante a reintrodução do oxigênio molecular (Salahudeen, 2004; Mitchell et al., 2010).

Espécies reativas de oxigênio podem originar-se de diversas fontes no tecido pós-isquêmico, tais como pelo metabolismo oxidativo mitocondrial, pela formação de xantina oxidase, prostaglandina H sintase e lipo-oxigenase (enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico), pelos neutrófilos ativados, auto-oxidação de catecolaminas e por enzimas oxidativas do retículo endoplasmático (citocromo P-450 e peroxissomos) (Baker et al., 1985; Bonventre, 1993; Mitchell et al., 2010).

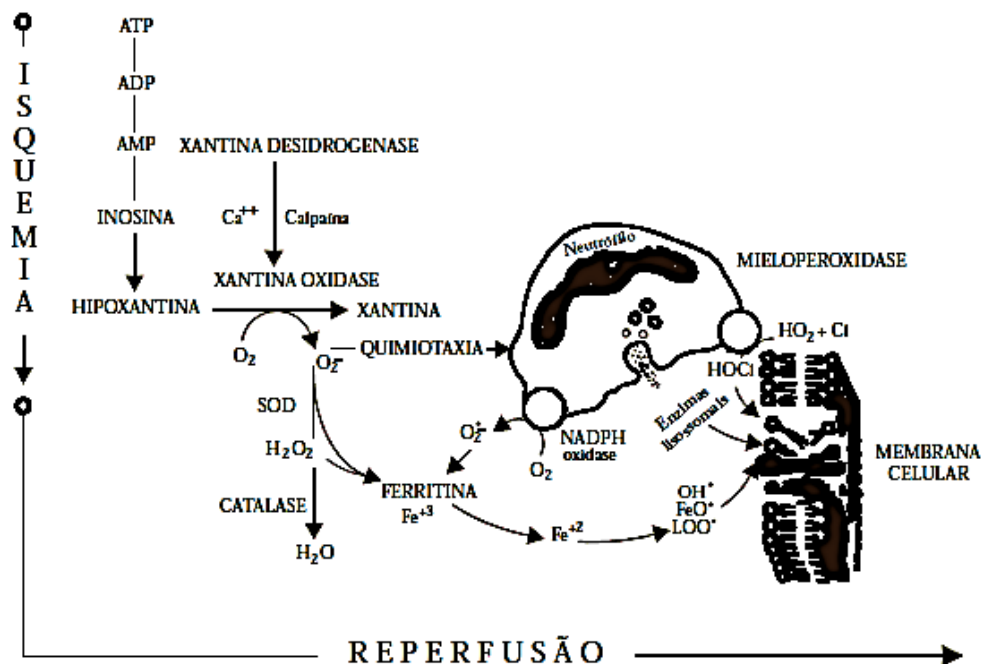
Em condições fisiológicas, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) é o aceptor final de elétrons na cadeia respiratória, que tem a enzima xantina desidrogenase catalisando essa reação, onde o produto final é a água. Todavia, em tecidos pós-isquêmicos, a hipoxantina formada pela degradação ininterrupta de ATP ocorrida na isquemia é convertida à xantina pela ação da enzima xantina oxidase, com liberação de radicais superóxido. A enzima superóxido dismutase converte os radicais superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (figura 3), o qual será convertido na mais reativa espécie de oxigênio, o radical hidroxila (OH^\cdot). Isto ocorre devido à alta disponibilidade de oxigênio molecular durante a reperusão, que é utilizado como aceptor final de elétrons, ao invés do NADPH (Silveira e Yoshida, 2004; Devarajan, 2006; Francischetti et al., 2010).

Os radicais superóxido formados também podem interagir com o óxido nítrico, promovendo sua deficiência funcional e formação de produtos citotóxicos, como o peróxido nítrico e o ácido peróxido nitroso. O peróxido nítrico é um importante gatilho para peroxidação lipídica, podendo causar danos ao DNA e nitração de proteínas (Galvão, 2009; Mitchell et al., 2010).

Os neutrófilos, importantes formadores de espécies reativas de oxigênio quando ativados, também geram o ânion superóxido em seus vacúolos fagocitários, pela ativação da NADPH-oxidase (oxidase nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), além

da formação de $\text{OH}\cdot$. A mieloperoxidase, oriunda dos neutrófilos, catalisa a reação do peróxido de hidrogênio na presença de cloro, formando o hipoclorito. Este composto é capaz de oxidar muitas moléculas de lipídeos e outros constituintes intracelulares (Galvão, 2009; Francischetti et al., 2010).

Figura 3 – Representação esquemática da degradação dos radicais superóxido pela enzima superóxido dismutase.



Fonte: Silveira e Yoshida, 2004.

Os radicais livres podem causar diversos danos ao organismo, como modificações nas bases purínicas e pirimídicas com inativação ou mutação do DNA, inativação de várias proteínas e também oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (peroxidação lipídica). Embora todos os componentes celulares sejam susceptíveis à ação dos radicais livres, a membrana é o mais atingido, acarretando em alterações em sua estrutura e permeabilidade (Ferreira e Matsubara, 1997; Pagliuso et al., 2006).

A peroxidação lipídica ocorre como uma reação em cadeia, onde há o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado da membrana celular, formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno

conjugado (hidrocarboneto de cadeia aberta com dupla ligação entre os carbonos). Esta reação inicia uma cascata de reações via lipo-oxigenases, mieloperoxidases e ciclo-oxigenases, que promoverão a formação de novos radicais, ativação da cascata inflamatória via ácido araquidônico, transtornos de permeabilidade celular e alterações celulares tóxicas no DNA (Ferreira e Matsubara, 1997; Lima e Abdalla, 2001).

Na reperfusão, ocorre também a maior oferta de cálcio intracelular, que ativa proteases cálcio-dependentes intracitoplasmáticas como a calpaína. Esta, ativa enzimas lisossômicas e a enzima fosfolipase A2, que degrada o ácido araquidônico, dando origem aos mediadores da inflamação. Os leucotrienos podem ligar-se a receptores da membrana celular de neutrófilos, levando à sua ativação e adesão, provocando vasoconstrição, piorando a isquemia. Os tromboxanos provocarão também vasoconstrição, agregação plaquetária e de neutrófilos, prejudicando a microcirculação já comprometida pela isquemia (Salahudeen, 2004; Silveira e Yoshida, 2004; Francischetti et al., 2010).

A estase leucocitária observada na região medular externa após a reperfusão renal pode potencialmente estender as lesões ocorridas durante a isquemia. Adicionalmente à obstrução da microcirculação, leucócitos podem iniciar uma cascata inflamatória. Uma vez ativados, os leucócitos liberam citocinas, proteases e mediadores da injúria oxidativa, os quais têm importante papel na fisiopatologia da lesão de células epiteliais e subsequente disfunção do órgão (Sutton et al., 2002). Nas células que sofrem danos mais graves, apoptose e necrose se desenvolvem, levando à morte celular (Bonventre e Zuk, 2004; Sharfuddin e Molitoris, 2011).

2.3.3.1 Estresse oxidativo e a peroxidação lipídica

Com o grande potencial lesivo das espécies reativas de oxigênio, é de vital importância um controle entre a produção destes compostos e sua degradação. Isto é possível devido à ação de antioxidantes presentes no organismo, que removem e mantêm os níveis de ERO em baixas concentrações (Galvão, 2009). Os antioxidantes que fazem parte do sistema de defesa celular atuam em duas linhas: uma detoxificadora, agindo antes que o agente cause lesão (glutathiona reduzida, superóxido dismutase,

catalase, glutathione peroxidase e vitamina E) e outra com função de reparar a lesão ocorrida (vitamina C, glutathione reductase e glutathione peroxidase) (Pagliuso et al., 2006).

A proteção detoxificadora do organismo contra espécies reativas de oxigênio conta com três sistemas enzimáticos antioxidantes. O primeiro é composto por dois tipos de enzimas SOD (superóxido dismutase), que catalisam a destruição do radical ânion superóxido (O_2^-), convertendo-o em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O segundo sistema de prevenção é formado pela enzima catalase que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (Barreiros et al., 2006). O processo de degradação do peróxido de hidrogênio tem papel fundamental, pois é a partir desta espécie que se origina o radical hidroxila, iniciador da peroxidação lipídica (Ferreira e Matsubara, 1997; Galvão, 2009).

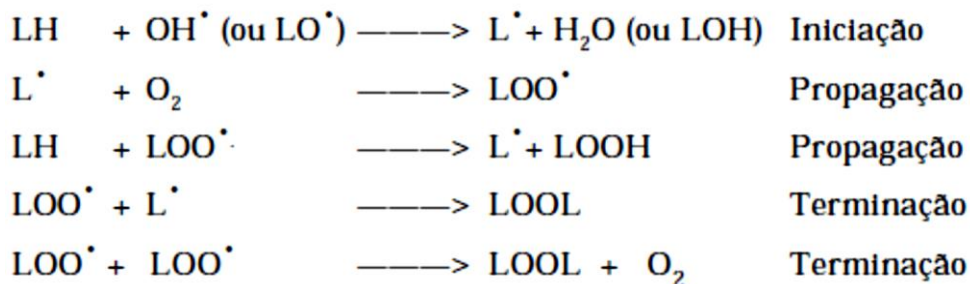
O terceiro sistema é composto pela glutathione (GSH), em conjunto com duas enzimas glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione reductase (GSH-Rd). A glutathione é o mais importante antioxidante endógeno, que na forma reduzida (GSH) e por meio da enzima glutathione peroxidase interage com os radicais, formando glutathione oxidada (GSSG) e água. A GSH-Px atua tanto sobre os peróxidos lipídicos como o peróxido de hidrogênio, reduzindo-os na presença de glutathione (fornecedora de hidrogênio) (Barreiros et al., 2006; Pagliuso et al., 2006).

Com a isquemia e reperfusão, pode haver quebra no equilíbrio existente entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante total do organismo, gerando o estresse oxidativo. O acúmulo desses radicais pode culminar em alterações morfofuncionais e conseqüentemente morte celular (Pagliuso et al., 2006).

Com o desenvolvimento do estresse oxidativo, inicia-se a peroxidação lipídica das membranas celulares, como representado na figura 4. A reação de lipoperoxidação tem início com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado (LH) da membrana. Este sequestro pode ser realizado pelo $OH\cdot$ ou pelo $LO\cdot$ (radical alcóxila), com conseqüente formação do $L\cdot$ (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o $L\cdot$ reage rapidamente com o O_2 , gerando $LOO\cdot$ (radical peróxila), que, por sua vez, sequestrará novo hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado, formando outra vez $L\cdot$ na segunda equação de propagação. O término da peroxidação lipídica ocorre quando os

radicais (L· e LOO·) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios (Ferreira e Matsubara, 1997; Lima e Abdalla, 2001).

Figura 4 - Representação esquemática das etapas de iniciação, propagação e terminação da peroxidação lipídica.



Fonte: Ferreira e Matsubara, 1997.

O processo de peroxidação lipídica também pode ser catalisado por íons ferro, pela conversão de hidroperóxidos lipídicos em radicais lipídicos altamente reativos, que iniciam nova cadeia de reações (Ferreira e Matsubara, 1997; Lima e Abdalla, 2001). Quelantes de ferro têm demonstrado bons resultados ao inibir as lesões tubulares provocadas pela isquemia fria e reperfusão (Bartels-Stringer et al., 2003; Salahudeen, 2004).

A avaliação direta da participação dos radicais livres não é indicada em decorrência da instabilidade química destes compostos que são altamente reativos. Para avaliar o papel dos radicais livres nas lesões, marcadores indiretos são utilizados, como a mensuração da atividade antioxidante (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase) e subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído, F2-isoprostano entre outros) (Lima e Abdalla, 2001; Galvão, 2009; Niki, 2013; Santos et al., 2013).

2.4 ALTERAÇÕES TISSULARES À HISTOPATOLOGIA

A insuficiência renal aguda pode ser classificada em três categorias: pré-renal, renal e pós-renal. Com o transplante, o órgão sofre injúrias classificadas como pré-renais durante o tempo em que é submetido à isquemia. No entanto, se o tempo de isquemia for mantido, as células renais passam a sofrer lesões em decorrência da depleção de

ATP, ficando susceptíveis ao desenvolvimento da IRA renal ou também chamada de intrínseca (Kosieradzki e Rowinski, 2008; Sharfuddin e Molitoris, 2011; Puiggròs, 2012).

Os achados histopatológicos estão relacionados aos mecanismos de lesões celulares, especialmente nos túbulos renais. Sob microscopia óptica e em condições fisiológicas, os túbulos normalmente apresentam uma espessa membrana basal, e estão separados entre si por um estroma intersticial discreto contendo capilares. Nas lesões tubulares, de forma geral, busca-se avaliar a presença de cilindros, focos de degeneração, regeneração e necrose. O interstício deve ser examinado quanto à presença de edema, fibrose, inflamação ou a combinação destes fatores (Vaden, 2004).

Os achados histológicos da lesão isquêmica mais comumente observados são a presença do edema, congestão capilar e vacuolização celular. Nas células do epitélio tubular proximal, as alterações na borda em escova, o achatamento do epitélio tubular, descamação celular na luz do túbulo com conseqüente desnudamento da membrana basal, obstrução e dilatação tubular são frequentemente observados (Feitosa et al., 2005; Devarajan, 2006; Tirapelli et al., 2009; Yurdakul et al., 2010). Por outro lado, os glomérulos podem manter um aspecto histológico próximo ao normal (Baker et al., 1985).

Picnose e cariólise são alterações morfológicas nucleares que podem ser consideradas irreversíveis. A ruptura da membrana plasmática também é uma modificação que demonstra a irreversibilidade da lesão, pois invariavelmente evolui para a morte celular por necrose, situações que não podem ser distinguidas apenas pela histopatologia (Padanilam, 2003; Feitosa et al., 2005).

As alterações observadas serão tanto mais significativas quanto maior for o tempo de isquemia fria seguido de reperfusão a que o órgão foi submetido. Há, ainda, clara influência de um longo tempo de isquemia fria no atraso da função do enxerto, que compromete a função e a sobrevivência do órgão transplantado (Salahudeen e May, 2008; Tirapelli et al., 2009; Pérez Valdivia et al., 2011; Van der Vliet et al., 2011).

CAPÍTULO 3

3 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE RICO EM ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA 3 NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E OXIDATIVA DE RINS SUBMETIDOS À ISQUEMIA FRIA E REPERFUSÃO – ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

(Effect of supplementation with fish oil rich in fatty acid polyunsaturated omega 3 in histological and oxidative evaluation of kidney submitted to cold ischemia and reperfusion – experimental study in rats)

RESUMO

A lesão renal por isquemia fria e os danos causados pela reperfusão continuam sendo um desafio no procedimento de transplante renal, devido ao risco de ocorrência de lesões morfofuncionais momentâneas ou permanentes no órgão. Os benefícios dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 são estudados em diversas doenças de caráter agudo e crônico, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antifibróticas, vasodilatadoras e antitrombogênicas. Neste estudo, objetivou-se comparar o estresse oxidativo e as alterações histopatológicas em rins de ratos Wistar submetidos à isquemia fria seguida de reperfusão em animais suplementados previamente por 30 dias com óleo de peixe rico em ômega 3 e animais não suplementados. Os animais foram submetidos à perfusão fria *in situ* por 15 minutos e reperfusão de 1 hora. Na avaliação do estresse oxidativo renal, os valores de superóxido dismutase ($p < 0,001$), catalase ($p < 0,05$) e glutathiona peroxidase ($p < 0,05$) encontraram-se diminuídos no grupo tratado em relação ao não tratado. Na histopatologia, observou-se que as lesões encontradas foram similares em todos os rins dos grupos submetidos à isquemia fria, independente da suplementação. Conclui-se neste estudo que o uso de óleo de peixe rico em ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 não conferiu nefroproteção ao insulto de isquemia fria e reperfusão *in situ*.

Palavras-chave: Nutracêutico. Transplante renal. Perfusão *in situ*. Estresse oxidativo. Histopatologia.

ABSTRACT

Renal injury due to cold ischemia and reperfusion damage remains a persistent problem in renal transplant procedure. It causes temporary or permanent morphological and functional lesions in the organ. Benefits of polyunsaturated omega 3 fatty acids has been studied in several diseases of acute and chronic character, due to its anti-inflammatory, antioxidant, antifibrotic, vessel dilator and antithrombogenic properties. The objective of this study was to compare the oxidative stress and histopathological alterations in kidneys of Wistar rats submitted to cold ischemia followed by reperfusion in animals pretreated for 30 days with fish oil rich in omega 3 and non-supplemented animals. The animals were subjected to in situ cold perfusion for 15 minutes and reperfusion for 1 hour. In the evaluation of renal oxidative stress, the values of superoxide dismutase ($p < 0.001$), catalase ($p < 0.05$) and glutathione peroxidase ($p < 0.05$) were decreased in the treated group, compared to the untreated. Histopathology revealed that the lesions were very similar in all groups of kidneys subjected to cold ischemia, regardless of group (treated or not). It is concluded that the use of fish oil rich in polyunsaturated omega 3 fatty acids did not confer nephroprotection insult cold ischemia and reperfusion in situ.

Keywords: Nutraceutical. Kidney transplantation. *In situ* perfusion. Oxidative stress. Histopathology.

3.1 INTRODUÇÃO

A família ômega 3, representada principalmente pelo ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA), é composta por ácidos graxos essenciais, poli-insaturados, fundamentais na composição fosfolipídica da membrana plasmática. Desempenham funções nutricionais, estruturais e reguladora dos lipídios, atuando de forma significativa na hemodinâmica e oxigenação, assim como na resposta inflamatória e controle de triglicerídeos (Waitzberg, 2009). Sua utilização vêm sendo estudada há cerca de 25 anos no tratamento de várias doenças renais de caráter agudo e crônico como a doença renal policística, glomerulopatia membranosa, nefrectomia 5/6, nefropatia diabética e lesão renal isquêmica (Fassett et al., 2010).

Durante o transplante renal, o período isquêmico pode comprometer negativamente a taxa de filtração glomerular, considerando-se que a arquitetura celular altamente diferenciada dos rins é dependente de um metabolismo aeróbio primário intenso (Sutton et al., 2002; Bonventre e Yang, 2011; Sharfuddin e Molitoris, 2011). Porém, a preservação da função do enxerto renal é de crucial importância, sendo então alvo de muitos estudos que visam melhores resultados (Mitchell et al., 2010; Yurdakul et al., 2010; Bon et al., 2012).

Um dos eventos mais precocemente observados com a isquemia é a redução dos níveis intracelulares de ATP, que expõe principalmente o túbulo proximal e a alça ascendente espessa de Henle, áreas mais susceptíveis do néfron por apresentarem elevado consumo energético (Andrade et al., 2004). A resposta inflamatória também é apontada como um importante evento, tendo a participação de células endoteliais, epiteliais e leucócitos (Bonventre e Zuk, 2004; Francischetti et al., 2010). Metabólitos do ácido araquidônico atuam como mediadores químicos e agentes quimiotáticos neste processo (Francischetti et al., 2010).

Após a isquemia, a reperfusão tecidual, ainda que fundamental para minimizar maiores danos, promove a circulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o restabelecimento do fluxo sanguíneo (Bulkley, 1987; Evora et al., 1996; Kumar, 2012). Quando em grande concentração, estes radicais esgotam as defesas antioxidantes do organismo, gerando o estresse oxidativo, que culmina em destruição das membranas celulares pela peroxidação lipídica e morte celular (Pagliuso et al., 2006).

O aumento nos níveis de EPA e DHA concomitante à redução na incorporação de ácido araquidônico nas membranas celulares renais diminui a disponibilidade deste substrato para produção de eicosanoides inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e citocinas pró-inflamatórias nos tecidos periféricos (Clark et al., 1991, Waitzberg, 2009). Ressalta-se também seu efeito antitrombogênico (Woodman et al., 2003), culminando em menor agregação plaquetária.

Uma vez que não existem trabalhos avaliando a utilização de ômega 3 pré-transplante renal, o objetivo deste estudo foi avaliar o estresse oxidativo e a histopatologia de rins de ratos submetidos à isquemia fria e reperfusão, sob efeito da

suplementação oral de óleo de peixe rico em ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, visando a nefroproteção.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob número de registro 742 (Anexo A). Após ciência do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, o experimento foi conduzido nas dependências desta Universidade, em parceria com a Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB).

Foram utilizados 28 ratos Wistar, machos adultos, pesando entre 400 e 450g, acondicionados em gaiolas com água e comida *ad libitum*, com temperatura de 23°C, umidade e ciclo dia-e-noite (12 horas) controlados.

O experimento constituiu um ensaio clínico transversal, aleatorizado e descritivo, sendo as análises histopatológicas e metabólicas realizadas de modo duplo-cego. Os animais foram divididos em três grupos: G1, G2 e G3. O G1 foi o grupo controle, composto por 8 animais sadios que não foram suplementados nem submetidos à isquemia fria e reperfusão. O G2 foi formado por dez animais que foram submetidos à lesão de isquemia renal fria e reperfusão, sem qualquer suplementação prévia. O G3 foi composto por dez animais que receberam suplementação com óleo de peixe durante 30 dias prévios ao procedimento de isquemia renal fria e reperfusão.

3.2.2 Óleo de peixe

Para a suplementação dos animais, foi utilizado óleo de peixe comercial¹ em cápsulas. Cada cápsula continha 0,3 g de ácidos graxos poli-insaturados marinhos, sendo 0,2g de ômega 3 EPA (ácido eicosapentaenoico) e 0,1g de ômega 3 DHA (ácido docosahexaenoico) – Proporção EPA:DHA de 2:1 (Anexo B). O óleo foi administrado por

¹Sundown – *Fish Oil* 1000mg®.

via oral na dose de 2g.Kg^{-1} de peso corporal ao dia. Imediatamente antes da administração, o óleo era retirado da cápsula por meio de seringa agulhada estéril e administrada diretamente na boca dos animais. A medicação utilizada foi armazenada ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

3.2.3 Procedimento cirúrgico

Para realização do procedimento de isquemia e reperfusão renal, a indução anestésica dos animais foi realizada com associação de cloridrato de quetamina², na dose de 50 mg.Kg^{-1} e 10 mg.Kg^{-1} de xilazina³, via intramuscular. A manutenção foi feita com máscara e inalação de isoflurano⁴, na concentração de 2,5%, utilizando-se vaporizador calibrado. A monitorização da frequência cardíaca e saturação de oxigênio foi realizada com doppler e oximetria de pulso, respectivamente. Após tricotomia abdominal, os animais foram fixados à mesa operatória aquecida ($36\text{-}37^{\circ}\text{C}$), em decúbito dorsal, sendo então executada antissepsia da região com iodopovidine, colocação de campos cirúrgicos e incisão mediana xifopubiana. A cirurgia foi realizada com magnificação óptica de 5X, com auxílio de microscópio óptico. A perfusão renal fria foi realizada em ambos os rins, para isso, aorta abdominal e veia cava caudal foram isoladas com cadarço vascular de silicone imediatamente cranial (de forma isolada) (figura 5A) e caudal (de forma agrupada) (figura 5B) à inserção da artéria mesentérica e das artérias e veias renais. O cadarço vascular foi inserido em um fragmento de sonda uretral, tracionado e ocluído com micro *clamp* vascular tipo *bulldog*. A artéria mesentérica foi seccionada e sua extremidade distal ligada. Pela porção proximal, um cateter vascular 22G⁵ foi inserido e um orifício puntiforme com o mandril foi feito na veia renal esquerda, para perfusão e drenagem da solução fria, respectivamente. A perfusão renal foi realizada *in situ* (figura 6) com a utilização da solução Euro-collins⁶ heparinizada⁷ a 4°C ,

²Ketamina 50[®] 50 mg.mL^{-1} , solução injetável esterilizara Holliday.

³Anasedan[®] 20mg.mL^{-1} , solução injetável esterilizara Vetbrands.

⁴Isoflurano[®] 1mL.1 mL^{-1} , solução inalatória BioChimico.

⁵BD Angiocath[™].

⁶Solução Euro-Collins[®], frasco com 1000mL Fresenius Kabi.

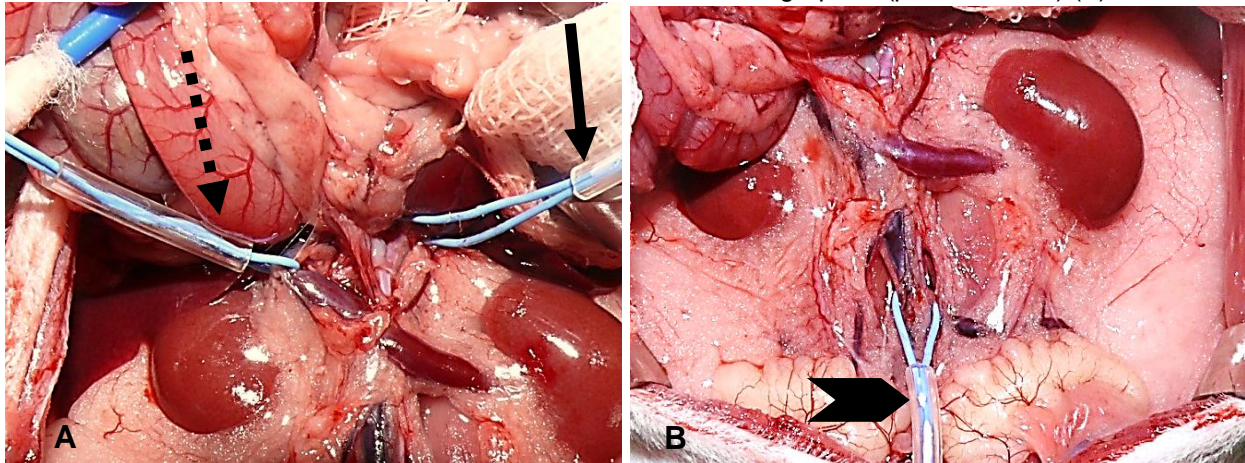
⁷Heparina sódica[®] 5000 UI.mL^{-1} , solução injetável esterilizara Ariston.

a qual foi preparada e homogeneizada imediatamente antes do uso. A taxa de perfusão foi mantida em $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ através de bomba⁸ de infusão contínua, por cerca de 15 minutos. Ao final, com os rins visivelmente pálidos (figura 7), o cateter foi removido e a artéria mesentérica ligada. A fim de padronizar o estudo, aqueles rins que ao final da perfusão não se encontravam completamente pálidos foram excluídos da amostra.

O orifício da veia renal esquerda foi ocluído com cola cirúrgica⁹. Os *clamps* vasculares caudais e craniais foram então removidos, nesta ordem, permitindo a reperusão do órgão. O fechamento da parede abdominal foi realizado em dois planos, com sutura contínua nos planos musculares e sutura de pele com pontos isolados simples, ambas com fio não absorvível sintético de nylon 4.0¹⁰.

No pós-operatório imediato, todos os animais receberam 3,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%¹¹ por via intraperitoneal e dipirona sódica¹² para analgesia, na dose de $8\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, por via subcutânea, sendo mantidos com máscara e fluxo de oxigênio de 1L/min e doppler vascular para monitorização de frequência cardíaca.

Figura 5 - Clampeamento da artéria aorta abdominal (seta cheia) e veia cava caudal (seta pontilhada) cranialmente à artéria mesentérica (A); e caudalmente de forma agrupada (ponta de seta) (B).



⁸ Bomba de seringa ST 680, Samtronic Infusion Systems.

⁹ N-butil cianocrilato – Vetbond™ 3M.

¹⁰ Safil® Green B/Braum.

¹¹ Cloreto de sódio 0,9%® frasco com 10mL Samtec.

¹² D-500® 500mg.mL⁻¹, solução injetável esterilizada Fort Dodge.

Figura 6 - Perfusão renal *in situ* com inserção de cateter 22 G na artéria Mesentérica (ponta de seta) e presença de pontos de isquemia após início da perfusão (asterisco).

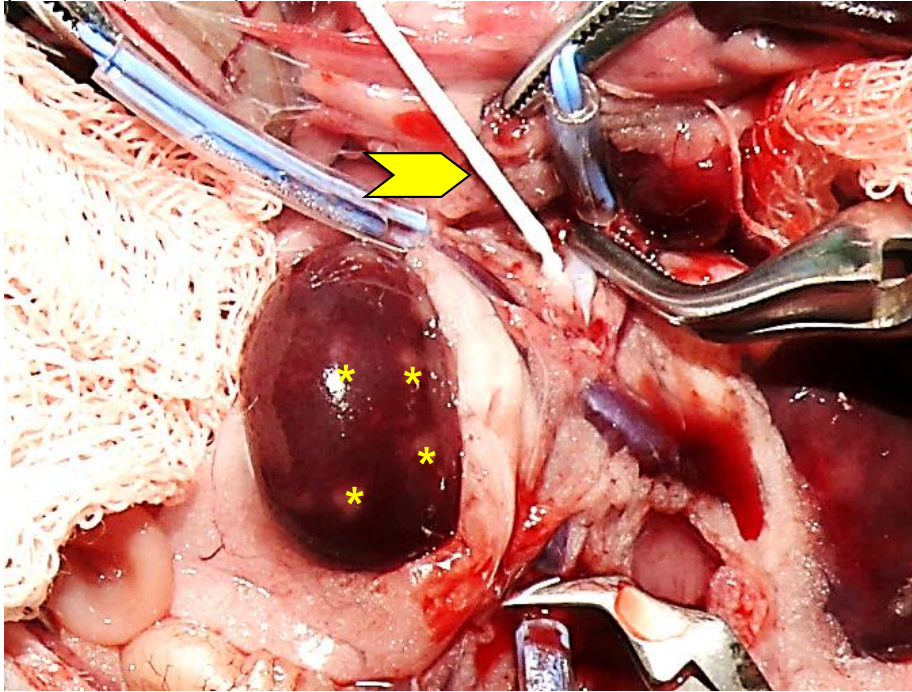
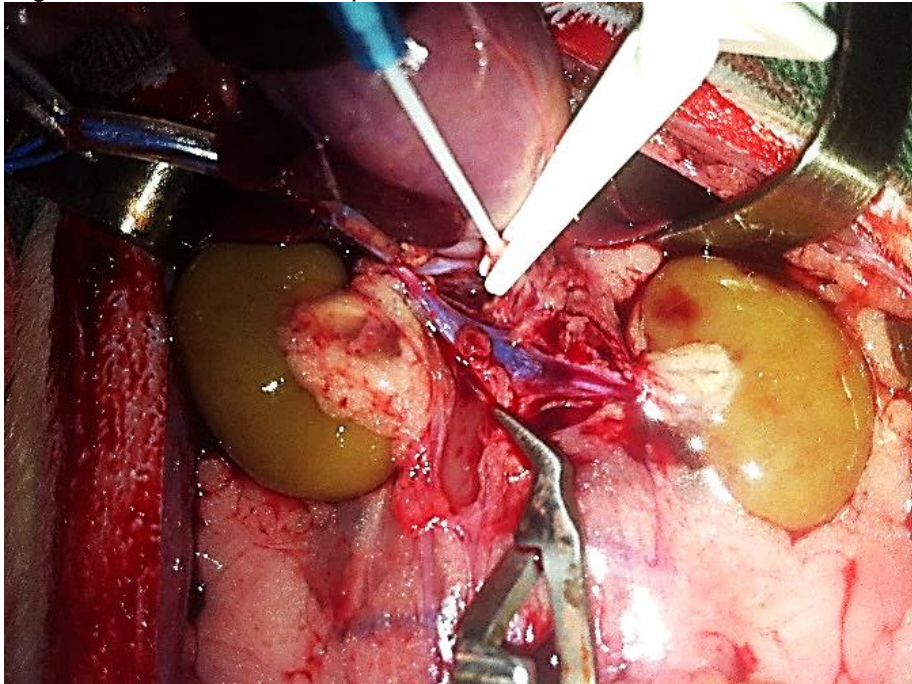


Figura 7 – Rins visivelmente pálidos ao término da infusão vascular fria.



3.2.4 Eutanásia dos animais

A eutanásia de todos os animais foi realizada após 1 hora de reperfusão renal, fazendo-se uso da associação de cloridrato de quetamina¹³ (50mg.Kg⁻¹) e xilazina¹⁴ (10mg.Kg⁻¹) intramuscular no caso de animais despertos, seguido por isoflurano inalatório¹⁵, até o momento de registro de parada cardiorrespiratória. Em animais ainda inconscientes, utilizou-se apenas isoflurano inalatório.

Após a eutanásia e nefrectomia, os rins foram seccionados longitudinalmente, sendo uma das metades acondicionada em freezer -80°C, para avaliação do estresse oxidativo e a outra metade em formaldeído 10%, destinada à análise histopatológica.

3.2.5 Estudo do estresse oxidativo renal

Dos fragmentos teciduais renais congelados a -80°C, 200mg foram homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, na presença de tampão fosfato de sódio (0,01M) pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 xg, por 15 minutos, a -4°C (Pereira et al., 1998). O sobrenadante foi utilizado para as determinações da atividade das enzimas antioxidantes.

3.2.5.1 Determinação da atividade da glutaciona peroxidase (GSH-Px – EC 1.11.1.9)

A atividade da glutaciona peroxidase foi determinada segundo método de Nakamura et al. (1974), na presença de peróxido de hidrogênio. A mistura de reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, NADPH₂, azida sódica, EDTA, glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona redutase. Através da oxidação do NADPH₂ a 340nm na presença da glutaciona redutase, a qual catalisa a redução da glutaciona oxidada (GSSG), determinou-se a atividade da GSH-Px.

¹³ Ketamina 50® 50 mg.mL⁻¹, solução injetável esterilizara Holliday.

¹⁴ Anasedan® 20 mg.mL⁻¹, solução injetável esterilizara Vetbrands.

¹⁵ Isoflurano® 1mL.1mL⁻¹, solução inalatória BioChimico.

3.2.5.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de Ewing e Janero (1995), tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O_2^- do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra.

3.2.5.3 Determinação da atividade da catalase (EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando 0,5mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras foram realizadas à 240nm (Aebi, 1974).

3.2.6 Análise histopatológica

Os rins conservados em solução de formaldeído 10% passaram por processo de inclusão em parafina quente, para realização de cortes de 4-5 mm por microtomia. Os fragmentos foram identificados, colocados em lâminas de vidro e receberam a coloração de hematoxilina-eosina (HE).

As lâminas foram lidas através de microscopia óptica, por patologista que desconhecia os protocolos de suplementação utilizados no estudo.

A análise histopatológica foi realizada adaptando-se aos critérios de Goujon et al. (1999), aplicados para avaliação das alterações sugestivas de necrose tubular aguda, utilizando-se 7 critérios passíveis de observação à microscopia óptica: vacuolização citoplasmática apical, descolamento celular, necrose tubular, presença de material eosinofílico na luz do túbulo, infiltrado inflamatório, dilatação e congestão. Este critérios foram graduados em escores conforme a abrangência das lesões: 1 - nenhuma anormalidade, 2 - lesões afetando 10% ou menos dos rins, 3 - lesões afetando 25% dos rins, 4 - lesões afetando 50% dos rins e 5 - 75% ou mais de lesão renal.

3.2.7 Análise estatística

Para a comparação das enzimas e análise do estresse oxidativo foi utilizado o teste ANOVA (*one-way*) seguidos do Teste de Bonferroni para comparação entre médias. O teste de normalidade utilizado foi Kolmogorof-Smirnoff e os dados estão apresentados em média e desvio padrão. Foi utilizado o nível de $\alpha=0,05$.

Para a análise dos critérios histopatológicos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney e os dados estão apresentados em mediana, com nível de $\alpha=0,05$. Para análise de todos os dados foi utilizado o software GraphPad Prism, 5.0, California, EUA.

3.3 RESULTADOS

Utilizando a técnica cirúrgica descrita, o índice de mortalidade foi de 30%. Com a modificação da técnica, a perfusão renal pela artéria mesentérica foi considerada um modo eficiente para reproduzir a isquemia e reperfusão, conferindo palidez renal.

Com relação à análise histopatológica, na avaliação individual de cada critério e comparando os grupos de animais não tratados (G2) com animais tratados com óleo de peixe rico em ômega 3 (G3), foi possível observar que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos. Os escores atribuídos a cada um dos critérios em seus respectivos grupos encontram-se descritos no Apêndice A. As medianas obtidas em cada critério nos grupos suplementados e não suplementados, encontram-se apresentadas no quadro a seguir.

Quadro 1 - Medianas dos escores correspondentes a cada critério avaliado nos grupos suplementados (G3) e não suplementados (G2).

Critério	Grupo	G2	G3
Vacuolização		4,5	3,5
Necrose tubular		3,5	3
Descolamento		3,5	3
Dilatação		1	1
Material eosinofílico		4,5	4
Inflamação		1	1
Congestão		4	4,5

Fotomicrografias das lesões histopatológicas tubulares observadas estão exemplificadas nas figuras 8 e 9 a seguir.

Figura 8 – Fotomicrografia de rins de ratos Wistar submetidos à isquemia fria e reperfusão, com suplementação de ômega 3. A - Acúmulo de material eosinofílico na luz tubular (seta cheia) (HE / 20x). B - Necrose tubular aguda (seta pontilhada) (HE / 40x).

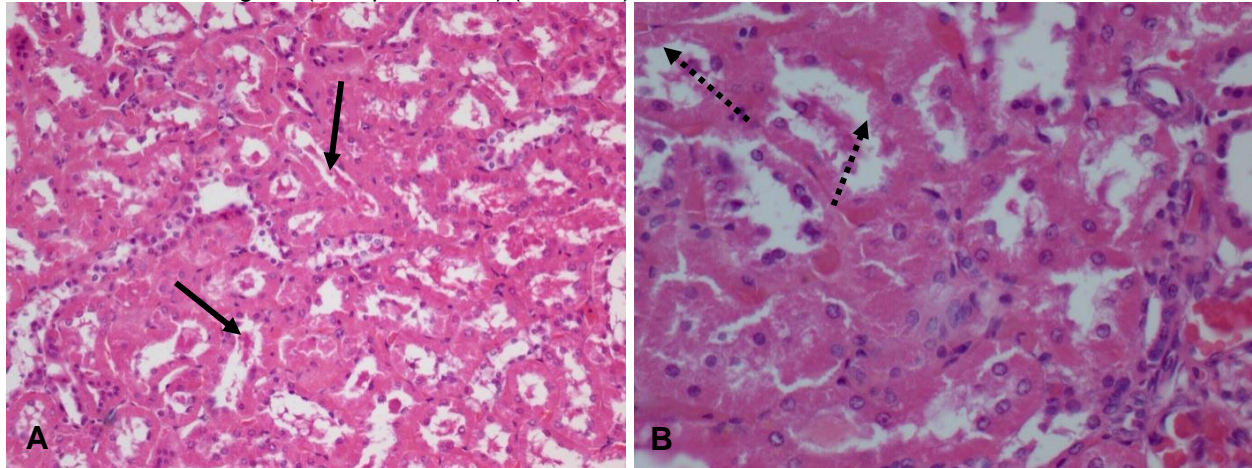
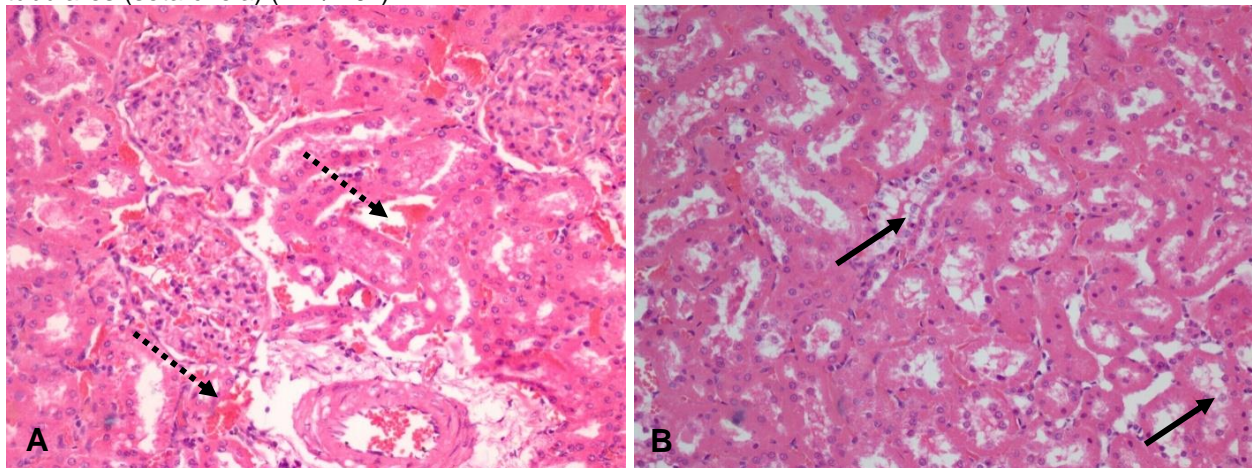


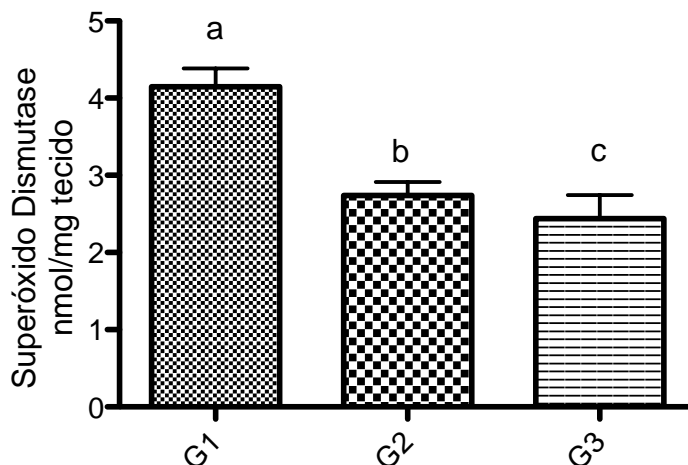
Figura 9 – Fotomicrografia de rins de ratos Wistar submetidos à isquemia fria e reperfusão, com suplementação de ômega 3. A - Congestão (seta pontilhada) (HE / 40x). B - Vacuolização das células tubulares (seta cheia) (HE / 20x).



Na avaliação do estresse oxidativo, os valores encontrados para a enzima superóxido dismutase apresentaram diferença estatística entre todos os grupos analisados, como pode ser observado de acordo com a figura 10. O valor da enzima superóxido dismutase foi mais elevado ($p < 0,001$) no grupo G1 ($4,149 \pm 0,2386$ nmol/mg

tecido), seguido pelos valores de G2 ($2,739 \pm 0,1738$ nmol/mg tecido) e G3 ($2,439 \pm 0,3040$ nmol/mg tecido).

Figura 10 - Concentração renal (nmol/mg) da enzima superóxido dismutase no grupo controle (G1) e nos grupos submetidos à isquemia renal fria e reperfusão, suplementados (G3) e não suplementados com AGPI ômega 3. Letras diferentes $p < 0,001$. As barras representam média e desvio padrão.



Comparando os valores de glutaciona peroxidase pode-se observar, de acordo com a figura 11, que houve diferença significativa em relação a todos os grupos analisados, sendo que G1 ($20,12 \pm 2,061$ nmol/mg tecido), representado por animais hígidos, apresentou os menores valores. O grupo G2 ($29,73 \pm 3,515$ nmol/mg tecido), que sofreu isquemia fria e reperfusão obteve os valores mais altos; enquanto o G3 ($24,44 \pm 1,586$ nmol/mg tecido), com animais suplementados com óleo de peixe foi significativamente menor que G2.

Analisando os valores de catalase, pode-se observar que também houve diferença significativa em relação a todos os grupos, de acordo com a figura 12. O grupo G1 apresentou o valor mais baixo de catalase ($11,60 \pm 3,904$ μ mol/g tecido) e o G2 apresentou o valor mais alto ($52,88 \pm 19,88$ μ mol/g tecido). O grupo G3 obteve um valor significativamente mais baixo ($28,99 \pm 6,587$ μ mol/g tecido) em relação ao G2.

Figura 11 - Concentração renal (nmol/mg) da enzima glutatona peroxidase no grupo controle (G1), e nos grupos submetidos à isquemia renal fria e reperfusão, suplementados (G3) e não suplementados (G2) com AGPI ômega 3. Letras diferentes $p < 0,05$. As barras representam média e desvio padrão.

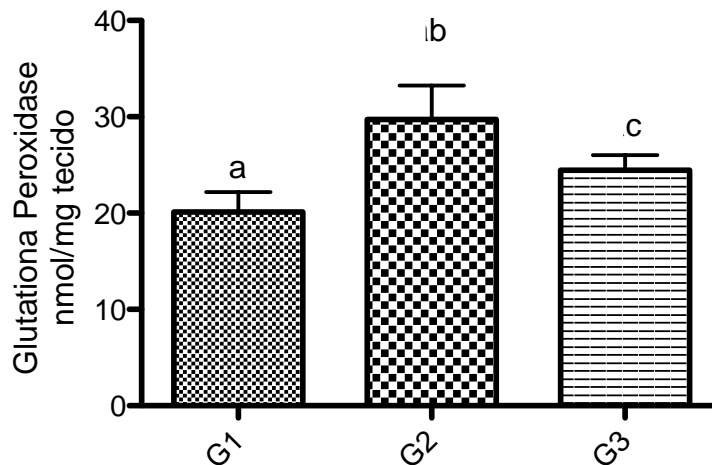
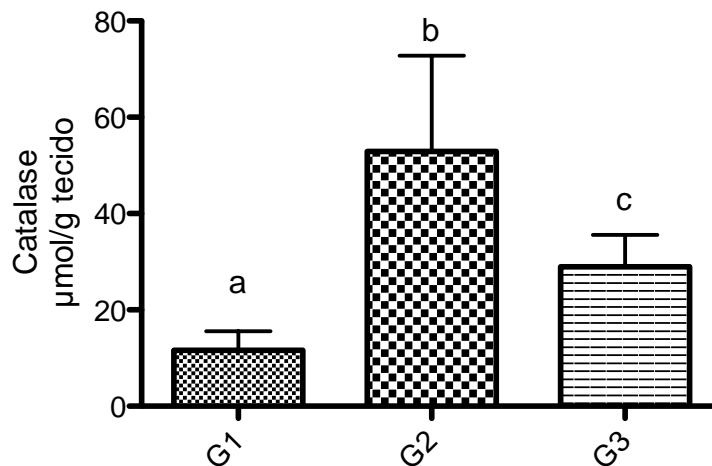


Figura 12 - Concentração renal ($\mu\text{mol/g}$) da enzima catalase no grupo controle (G1), e nos grupos submetidos à isquemia renal fria e reperfusão, suplementados (G3) e não suplementados (G2) com AGPI ômega 3. Letras diferentes $p < 0,05$. As barras representam média e desvio padrão.



3.4 DISCUSSÃO

Para o estudo das lesões decorrentes das etapas de isquemia e reperfusão diversos modelos experimentais têm sido utilizados. São mais frequentes na literatura estudos

envolvendo isquemia quente, o que reflete a praticidade da técnica (Yurdakul et al., 2010, Meyer et al., 2011, Cong et al., 2013). Outros autores avaliam a nefroproteção à isquemia utilizando a técnica de resfriamento, como Allam et al. (2010), cuja hipotermia foi realizada por meio da circulação de água fria por uma bolsa ao redor do rim e Santos et al. (2013) que utilizaram solução salina congelada em volta do rim clampeado.

Huang et al. (2003) descreveram um modelo experimental de transplante renal em ratos Wistar, com o auxílio de microscópio cirúrgico para a realização das anastomoses vasculares. Porém, a curva de aprendizado para esta complexa técnica microcirúrgica envolvendo o autotransplante pode resultar em possíveis alterações decorrentes de estenoses no sítio da anastomose vascular. Esta interferência negativa comprometeria a qualidade dos resultados finais.

Portanto, para a reprodução experimental do transplante renal inter-vivos optou-se pela técnica de isquemia e reperfusão renal *in situ*. Esta técnica possibilitou uma aproximação da realidade cirúrgica dos transplantes, permitindo avaliar isquemia e perfusão renal fria com solução específica (Euro-Collins), além da reperfusão.

Existem alguns modelos experimentais *in situ* descritos. Regner et al. (2010) realizaram infusão renal por meio de agulha 27G inserida na artéria renal. Takada et al. (1997) e Saba et al. (2008) descreveram uma técnica experimental semelhante à utilizada em nosso estudo, com a oclusão do fluxo da aorta abdominal e perfusão realizada pela aorta com o fluxo sendo drenado pela veia renal esquerda.

No presente estudo, a perfusão realizada por meio da artéria mesentérica foi o mecanismo utilizado com finalidade de evitar lesões na artéria renal ou aorta abdominal que pudessem causar comprometimento da reperfusão do órgão. Após realizada a perfusão, esta artéria foi ligada, sem prejuízos ao animal, que foi submetido à eutanásia 1 hora após ao procedimento. Além disso, o cateter com menor diâmetro disponível no país (24G) apresenta diâmetro próximo aos vasos em questão, sendo incompatível com as técnicas de cateterização descritas por outros autores (Regner et al., 2010).

A infusão vascular fria pela artéria mesentérica mostrou-se um procedimento eficaz, com os rins tornando-se pálidos rapidamente e de modo uniforme. No modelo experimental utilizado, destaca-se também a manutenção do rim contralateral, sem necessidade de nefrectomia, tendo-se em vista que a realização do procedimento de

perfusão foi realizado em ambos os rins. Isto difere de outros métodos experimentais de isquemia renal, onde há a necessidade de nefrectomia para que o rim não submetido à isquemia não interfira nos resultados (Percário, 2010; Regner et al., 2010), tendo como desvantagem a imediata perda de 50% do total de massa renal funcional.

O tempo de 15 minutos de perfusão, estabelecido por um estudo piloto, foi suficiente para que a solução infundida tornasse o rim pálido à observação, sugerindo total remoção sanguínea do órgão e com menor mortalidade. Nesse estudo, o tempo de reperfusão foi inicialmente estabelecido em 6 horas; porém, o índice de mortalidade foi alto e os animais sobreviventes apresentavam bradicardia no pós-operatório, conseqüentemente comprometendo a reperfusão renal. A eutanásia realizada com 1 hora de reperfusão reduziu o índice de mortalidade para 30%. Nossos dados diferem daqueles relatados por Saba et al. (2008), que realizaram 40 minutos de perfusão após clampeamento da aorta abdominal e 18 horas de reperfusão, sem relatos de óbitos.

O tempo entre o clampeamento dos vasos e o início da perfusão vascular fria com solução de Euro-Collins não excedeu 3 minutos, como observado nos procedimentos de transplante renal inter-vivos (Snoeijs et al., 2011).

A dose de óleo de peixe utilizada baseou-se em experimentos anteriores em ratos (Mosko, 2013). Conforme levantamento realizado por Fassett et al. (2010), existem ainda muitas dúvidas entre os pesquisadores em relação à dose utilizada, à proporção de DHA e EPA utilizada, ao tempo de tratamento e ao tamanho das amostras populacionais estudadas.

No estudo das alterações histológicas, a fim de evitar uma análise subjetiva e sem critérios pré-estabelecidos, tendo em vista que no rim submetido à isquemia/reperfusão as estruturas mais afetadas são as células tubulares, optou-se pela adaptação da escala de Goujon et al. (1999) para a padronização das lesões observadas.

Embora exista uma grande diversidade de métodos de análise histopatológica (De Cock et al., 2004; Sabbagh et al., 2011), de acordo com Tirapelli et al. (2009), para a avaliação da lesão renal pós-isquêmica a análise proposta por Goujon et al. (1999) permite maior acurácia e descrição do grau da lesão de forma mais detalhada.

Os dados encontrados na análise histológica estão de acordo com o observado por Mosko (2013), que não encontrou diferenças significativas entre rins de ratos Wistar

suplementados com óleo de peixe e ratos não suplementados, submetidos à isquemia renal quente e eutanásia em 24 horas, sob os critérios de Goujon et al. (1999).

No presente estudo, pôde-se observar ainda que os critérios de dilatação e inflamação apresentam-se qualificados com escore 1 (nenhuma anormalidade) em todos os animais submetidos à isquemia fria e reperfusão, tratados com óleo de peixe ou não. Já no estudo desenvolvido por Mosko (2013), todos os animais submetidos à isquemia quente, eutanasiados com 24 horas e 30 dias após a lesão, apresentavam no critério dilatação os escores variando de 2 (lesão afetando 10% ou menos do rim) a 3 (lesão afetando 25% do rim). No critério inflamação, Mosko (2013) encontrou escore 1 em todos os animais eutanasiados com 24 horas após a lesão. Estas observações podem ser explicadas pela precocidade da análise. De acordo com Jablonski et al. (1983), a verdadeira extensão da lesão pode ser vista de 24 a 72 horas após a reperfusão. Como esperado, resultados normais para alguns critérios foram encontrados neste estudo, em que a eutanásia foi realizada com 1 hora de reperfusão.

Na avaliação do estresse oxidativo, os valores de catalase e glutathione peroxidase nos animais suplementados com óleo de peixe (G3) apresentaram-se abaixo daqueles encontrados nos animais não suplementados (G2). A menor atividade enzimática no grupo suplementado reflete a falta de proteção contra a agressão oxidativa, tornando as células predispostas à peroxidação lipídica.

A expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) é regulada pela presença de radicais superóxidos. Uma vez que a produção de superóxidos está aumentada na síndrome de isquemia e reperfusão (Zhan et al., 2004), é esperada uma alta atividade enzimática. No entanto, a atividade enzimática dos animais que sofreram isquemia e reperfusão (G2 e G3) foi diminuída em relação ao grupo controle, sugerindo uma inabilidade destes animais em montar uma resposta satisfatória.

Alguns autores sugerem ainda, que o motivo dessa queda na atividade enzimática seja devido ao sequestro dos radicais superóxidos pelo óxido nítrico e inativação via nitração da tirosina e oxidação de resíduos da tirosina (Zhan et al., 2004; Saba et al., 2008; Mitchell et al., 2010).

Os valores encontrados em SOD neste estudo estão de acordo com o observado por Yun et al. (2009), em que os autores compararam ratos submetidos a isquemia e

reperusão com animais submetidos ao pré ou pós-condicionamento isquêmico. Nesse estudo, os valores de SOD nos animais que sofreram isquemia e reperusão estavam abaixo daqueles encontrados nos animais do grupo controle, assim como nesta pesquisa.

Em outro estudo avaliando a interferência de um polissacarídeo obtido a partir de raízes de *Dipsacus asperoides* na isquemia e reperusão renal induzida em ratos, Cong et al. (2013) também observaram uma redução significativa nos valores de SOD nos grupos submetidos à I/R em relação aos animais sadios e tratados, tanto na avaliação sorológica como na tecidual.

A queda na atividade da SOD nos animais suplementados com óleo de peixe (G3) sugere que a suplementação conferiu menor potencial antioxidante contra a agressão oxidativa induzida pela isquemia e reperusão.

De acordo com El-Demerdash et al. (2013), o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que não são adequadamente neutralizadas pelos mecanismos antioxidantes resulta em estresse oxidativo e estas são potencialmente danosas ao tecido, sendo a peroxidação lipídica uma consequência da depleção nos valores das enzimas antioxidantes, que tem papel fundamental na defesa celular contra radicais livres.

Em estudos anteriores, evidências apontam os efeitos benéficos na administração de ácido graxo ômega 3 em pacientes com alterações renais (Holm et al., 2001; Lauretani et al., 2009; Fasset et al., 2010; Palaniswamy et al., 2013). Fernandes et al. (2012) observaram efeito benéfico ao comparar ratos submetidos à nefrectomia 5/6 e suplementados com diferentes dietas. Nesse estudo, a dieta com óleo de peixe significativamente reduziu as lesões histológicas, melhorou a função renal e retardou a progressão da doença renal crônica experimental. No entanto, os benefícios da utilização de ômega 3 têm sido relatados em lesões crônicas, progressivas, de caráter inflamatório, com patofisiologias diferentes da observada neste estudo, representado por alterações agudas.

Existem ainda, algumas preocupações em relação à utilização de AGPI devido à seu alto grau de insaturação, o que torna as membranas celulares mais susceptíveis à peroxidação lipídica por ação de radicais livres. Os aldeídos formados a partir da

peroxidação lipídica de AGPI, tais como 4-hidroxy-nonenal e 4-hydroxyhexenal são altamente reativos e oxidativos, podendo desencadear a apoptose, além de exercer efeito citotóxico devido à ação sobre proteínas. Estes aldeídos têm ainda o potencial de prejudicar a função mitocondrial via alteração do metabolismo da glutatona, induzindo o estresse oxidativo (Al-Gubory, 2012).

De acordo com Ibrahim et al. (1999), um efeito pró-oxidante foi observado na alta ingestão de óleo de peixe por ratos, sugerindo que os lipídios da dieta tem importante papel na determinação da susceptibilidade celular ao estresse oxidativo.

O óleo de peixe é ainda bastante sensível a luz e oxigênio, com risco de sofrer oxidação lipídica quando mal armazenado, levando a formação de malondialdeído e 4-hidroxi-2-nonenal, capazes de realizar ligações covalentes com os ácidos nucleicos. No presente estudo, o manejo de administração do óleo de peixe não interferiu com o resultado final, uma vez que o óleo foi administrado aos animais imediatamente após retirado da cápsula de forma estéril. O armazenamento do óleo também foi realizado de forma correta, conforme orientações do fabricante. Além disso, de acordo com Pacheco (2005), a oxidação dos ácidos graxos EPA e DHA ocorre entre 3 a 5 dias de contato com o oxigênio e abrigados da luz.

Ramezani et al. (2011) estudaram dois grupos de pacientes receptores de transplante renal, um grupo suplementado com 6g/dia de ômega 3 e outro grupo utilizando placebo. Foram realizadas avaliações na concentração de 8-isoprostano nos momentos pós-operatório imediato, no terceiro e sexto mês; e os autores concluíram que o uso de ômega 3 administrado não apresentou nenhum efeito benéfico no estresse oxidativo de pacientes transplantados.

Ainda, Khosroshahi et al. (2013), avaliando o efeito da suplementação de ômega 3 no perfil lipídico e na peroxidação lipídica em 30 pacientes após receberem o transplante renal, concluíram que o estudo do ômega 3 não demonstrou efeito benéfico no perfil e peroxidação lipídica.

Deste modo, os resultados encontrados neste estudo corroboram as informações fornecidas por estudos anteriores (Ramezani et al., 2011; Khosroshahi et al., 2013), nos quais o ômega 3 não ofereceu efeito benéfico. Ressalta-se ainda que a administração de óleo de peixe rico em ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 teve efeito deletério

quando comparado aos animais que não foram suplementados, evidenciado pela diminuição da atividade das enzimas antioxidantes.

3.5 CONCLUSÃO

Pôde-se concluir a partir deste estudo, que a suplementação de 2g.Kg^{-1} de óleo de peixe rico em ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 em ratos Wistar submetidos à isquemia renal fria seguida de reperfusão, não conferiu proteção renal quanto à agressão oxidativa, aumentando a predisposição à peroxidação lipídica.

Concluiu-se ainda, que o uso de AGPI-n3 não ofereceu nefroproteção quanto às lesões histológicas tubulares de isquemia e reperfusão.

CAPÍTULO 4

4 CONCLUSÃO GERAL

Concluiu-se que a suplementação com óleo de peixe rico em AGPI-n3 não ofereceu proteção renal aos animais tratados, aumentando a predisposição à peroxidação lipídica. Estes resultados demonstram que o uso do ácido graxo ômega 3 como nutracêutico profilático nas condições avaliadas neste estudo não trará benefícios ao paciente, podendo agravar a lesão oxidativa renal existente.

REFERÊNCIAS

't Hart NA, Leuvenink HGD, Ploeg RJ. New solutions in organ preservation. *Transplantation Reviews*. 2002; 16: 131-141.

Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis academic*. New York: Academic Press; 1974. p. 673-677.

Aikawa J. Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a caquexia, o crescimento tumoral e o sistema imunitário em ratos F2 (Dissertação de mestrado). Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2004.

Al-Gubory KH. Mitochondria: omega-3 in the route of mitochondrial reactive oxygen species. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2012; 44: 1569-1573.

Allam CL, Xu M, Medendorp A, Knight R, Dixon P, Weld KJ. Determination of renal hypothermic temperature adequacy for renoprotection during ischemia using renal interstitial glycerol concentrations in a porcine model. *Urology*. 2010; 2: 508.e1-508.e4.

An WS, Kim HJ, Cho KH, Vaziri ND. Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. *American Journal of Physiology- Renal Physiology*. 2009; 297: F895-F903.

Andrade SC, Dezoti C, Shibuya CA, Watanabe M, Vattimo MFF. Insuficiência renal aguda isquêmica: efeitos comparativos do alopurinol e n-acetilcisteína como antioxidantes. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2004; 26: 69-75.

Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion- protective effect of superoxide dismutase. *Annals of Surgery*. 1985; 202: 628-641.

Barbalho SM, Bechara MD, Quesada KR, Goulart RA. Papel dos ácidos graxos ômega 3 na resolução dos processos inflamatórios. *Medicina*. 2011; 44: 234-240.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2006; 29: 113-123.

Bartels-Stringer M, Kramers C, Wetzels JFM, Russel FGM, de Groot H, Rauen U. Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. *Cryobiology*. 2003; 47: 82-91.

Berenbaum F. COX-3: fact or fancy? *Joint Bone Spine*. 2004; 71: 451-453.

Bon D, Chatauret N, Giraud S, Thuillier R, Favreau F, Hauet T. New strategies to optimize kidney recovery and preservation in transplantation. *Nature Reviews Nephrology*. 2012; 8:339-347.

Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney International*. 1993; 43: 1160-1178.

Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011; 121:4210-4221.

Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney International*. 2004; 66: 480-485.

Brodsky SV, Yamamoto T, Tada T, Kim B, Chen J, Kajiya F, Goligorsky MS. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. *American Journal of Physiology – Renal Physiology*. 2002; 282: F1140-F1149.

Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *British Journal of Cancer*. 1987; 8: 66-73.

Clark WF, Parbtani A, Philbrick DJ, Holub BJ, Huff MW. Chronic effects of ω -3 fatty acids (fish oil) in a rat 5/6 renal ablation model. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1991; 1: 1343-1353.

Cobo JLE, Gallegos FR. Preservación de órganos. *Medicina Intensiva*. 2009; 33: 282-292.

Cong G, Cui L, Zang M, Hao L. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by a polysaccharide from the roots of *Dipsacus asperoides*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013; 56: 14-19.

De Cock HEV, Kyles AE, Griffey SM, Bernstein L, Gregory CR. Histopathologic findings and classification of feline renal transplants. *Veterinary Pathology*. 2004; 41: 244-256.

Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006; 17: 1503-1520.

El-Demerdash F, Dewar Y, ElMazoudy RH, Attia AA. Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1 mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2013; 65: 897-901.

Evora PRB, Pearson PJ, Seccombe JF, Schaff HV. Lesão de isquemia-reperfusão – Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 1996; 66: 239-245.

Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry*. 1995; 232: 243-248.

Fassett RG, Gobe GC, Peake JM, Coombes JS. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of kidney disease. *American Journal of Kidney Diseases*. 2010; 56:728-742.

Feitosa EAN, Taha MO, Fagundes DJ, Takiya CM, Cardoso LR, Campos DM. Estudo da morfologia renal após a oclusão da aorta abdominal infra-renal em ratos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2005; 32: 178-182.

Fernandes MB, Caldas HC, Martins LR, Ferreira CC, Baptista MASF, Fernandes IMM, Abbud-Filho M. Effects of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the treatment of experimental chronic renal failure. *International Urology and Nephrology*. 2012; 44: 1571-1576.

Fernandez R, Piechnik J, Fabris R, Malnic G, Fernandes LC. Effect of chronic fish oil supplementation on renal function of normal and cachectic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004; 37: 1481-1489.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1997; 43: 61-68.

Francischetti I, Moreno JB, Scholz M, Yoshida WB. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão isquemia-reperfusão. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 2010; 25:575-584.

Fuller BJ. Organ preservation: the profit and loss account of using hypothermia to maintain viability. *Transplantation Reviews*. 1999; 13: 55-66.

Galvão, ALB. Estresse oxidativo nos estágios finais da doença renal crônica em pequenos animais. *Archives of Veterinary Science*. 2009; 14: 178-186.

Gomes TKC, Oliveira SL. O papel dos ácidos graxos essenciais no perfil de eicosanoides e sua repercussão na resposta imune. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*. 2010; 35: 167-186.

Goujon JM, Hauet T, Menet E, Levillain P, Babin P, Carretier M. Histological evaluation of proximal tubule cell injury in isolated perfused pig kidneys exposed to cold ischemia. *Journal of Surgical Research*. 1999; 82: 228-233.

Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV, Fuller BJ. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2011; 38: 125-142.

Harvig B, Kallskog O, Norlén BJ. Effects of cold ischemia on the preserved rat kidney: intrarenal distribution of perfusate. *Cryobiology*. 1980; 17: 478-485.

Hassan IR, Gronert K. Acute changes in dietary ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids have a pronounced impact on survival following ischemic renal injury and formation of renoprotective docosahexaenoic acid-derived protection D1. *The Journal of Immunology*. 2009; 182: 3223-3232.

Henry SD, Guarrera JV. Protective effects of hypothermic ex vivo perfusion on ischemia/reperfusion injury and transplant outcomes. *Transplantation Reviews*. 2012; 26: 163-175.

Holm T, Andreassen AK, Aukrust P, Andersen K, Geiran OR, Kjekshus J, Simonsen S, Gullestad L. Omega-3 fatty acids improve blood pressure control and preserve renal function in hypertensive heart transplant recipients. *European Heart Journal*. 2001; 22: 428-436.

Huang H, He Z, Roberts LJ, Salahudeen AK. Deferoxamine reduces cold-ischemic renal injury in a syngeneic kidney transplant model. *American Journal of Transplantation*. 2003; 3: 1531-1537.

Ibrahim W, Lee U, Szabo J, Bruckner G, Chow CK. Oxidative stress and antioxidant status in mouse kidney: effects of dietary lipid and vitamin E plus iron. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 1999; 10: 674-678.

Jablonski P, Howden O, Rae DA, Birrel CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation*. 1983; 35: 198-204.

Knight AJ, Nicholson ML. Methods of renal preservation. *Transplantation Reviews*. 2001; 15: 68-81.

Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplantation Proceedings*. 2008; 40:3279-3288.

Khosroshahi HT, Toomatari SEM, Salamat SA, Moin GD, Khosroshahi SN. Effectiveness of omega-3 supplement on lipid profile and lipid peroxidation in kidney allograft recipients. *Nephro-Urology Monthly*. 2013; 5: 822-826.

Kumar J. Pathophysiology of ischemic acute tubular necrosis. *Clinical Queries: Nephrology*. 2012; 101:18-26.

Lauretani F, Maggio M, Pizzarelli F, Michelassi S, Ruggiero C, Ceda GP, Bandinelli S, Ferrucci L. Omega-3 and renal function in older adults. *Current Pharmaceutical Design*. 2009; 15: 4149-4156.

Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2001; 37: 293-303.

Liu JC, Conklin SM, Manuck SB, Yao JK, Muldoon MF. Long-chain omega-3 fatty acids and blood pressure. *American Journal of Hypertension*. 2011; 24: 1121-1126.

Lledo-Garcia E, Hernandez-Fernandez C, Pedemonte G, Rodriguez-Martinez D, Tejedor-Jorge A, Francisco del Cañizo-Lopez J. Effects of hypothermic perfusion in isolated pig kidneys after warm ischemia. *Transplantation Proceedings*. 2007; 39: 258-260.

López-Novoa JM. Ciclooxygenasas y función renal. *Hipertensión*. 2006; 23: 1-3.

Martin CA, Almeida VV, Ruiz MR, Visentainer JEL, Matshushita M, Souza NE, Visentainer JV. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*. 2006; 19: 761-770.

Matsumoto T, Nakayama N, Ishida K, Kobayashi T, Kamata K. Eicosapentaenoic acid improves imbalance between vasodilator and vasoconstrictor actions of endothelium-derived factors in mesenteric arteries from rats at chronic stage of type 2 diabetes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009; 329: 324-334.

Meyer F, Silva DS, Bombonato GM, Lizana JN, Dziedricki LF, Krieger ML. Histological analysis and the blood flux in kidneys submitted to different periods of ischemia/reperfusion. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2011; 26: 451-455.

Mitchell T, Saba H, Laakman J, Parajuli N, MacMillan-Crow LA. Role of mitochondrial-derived oxidants in renal tubular cell cold-storage injury. *Free Radical Biology & Medicine*. 2010; 49: 1273-1282.

Molitoris BA, Geerdes A, McIntosh JR. Dissociation and redistribution of Na⁺,K⁺-ATPase from its surface membrane actin cytoskeletal complex during cellular ATP depletion. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 88:462-469.

Moraes FP, Colla LM. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2006; 3:109-122.

Mosko PRE. Impacto da suplementação de óleo de peixe rico em ácido graxo poli-insaturado ômega 3 sobre a função e morfologia renal de ratos wistar submetidos à isquemia quente (Dissertação de Mestrado). São José dos Pinhais, PR: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2013.

Neumayer HH, Heinrich M, Schmissas M, Haller H, Wagner K, Luft FC. Amelioration of ischemic acute renal failure by dietary fish oil administration in conscious dogs. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1992; 3: 1312-1320.

Niki E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et Biophysica Acta* (2013). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.020>

Pacheco SGA. Estabilidade oxidativa de óleo de peixe encapsulado e acondicionado em diferentes tipos de embalagens em condição ambiente (Dissertação de mestrado). Piracaba, SP: Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo; 2005.

Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2003; 284: F608-F627.

Pagliuso RG, Goloni-Bertollo EM, Abbud Filho M, Pavarino-Bertelli EC. Estresse oxidativo e disfunção crônica do enxerto renal. *Arquivos de Ciências da Saúde*. 2006; 13: 223-227.

Palaniswamy KS, Vishwanadha VP, Singaravelu SR. Fish oil rich in eicosapentaenoic acid protects against oxidative stress-related renal dysfunction induced by TCDD in Wistar rats. *Cell Stress and Chaperones*. 2013; 1-11.

Percário S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. *Revista de Nutrição*. 2010; 23: 259-267.

Pereira B, Costa-Rosa LFBP, Bechara EJH, Newsholme P, Curi R. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidases activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adreno medullated rats. 1998; 31: 827-833.

Peres LAB, Mocelin AJ, Delfino VDA. Injúria da isquemia/reperfusão: implicações no transplante renal. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2005; 17: 207-214.

Pérez Valdivia MA, Gentil MA, Toro M, Cabello M, Rodríguez-Benot A, Mazuecos A, Osuna A, Alonso M. Impact of cold ischemia time on initial graft function and survival rates in renal transplants from deceased donors performed in Andalusia. *Transplantation Proceedings*. 2011; 43: 2174-2176.

Puiggròs JG. Insuficiência renal aguda. In: Cortadellas O, editor. *Manual de nefrologia e urologia clínica canina e felina*. São Paulo: Editora MedVet; 2012. p. 149-159.

Ramezani M, Nazemian F, Shamsara J, Koohrokli R, Mohammadpour AH. Effect of omega-3 fatty acids on plasma level of 8-isoprostane in kidneys transplant patients. *Journal of renal Nutrition*. 2011; 21: 196-199.

Regner KR, Nilakantan V, Ryan RP, Mortensen J, White SM, Shames BD, Roman RJ. Protective effect of Lifer Solution in experimental renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*. 2010; 164: e291-e297.

Rhoden EL, Rhoden CR, Lucas ML, Pereira-Lima L, Zettler C, Belló-Klein A. The role of nitric oxide pathway in the renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplant Immunology*. 2002; 10: 277-284.

Robinson DR, Urakaze M, Huang R, Taki H, Sugiyama E, Knoell CT, Xu L, Yeh ETH, Auron PE. Dietary marine lipids suppress continuous expression of interleukin-1 β gene transcription. *Lipids*. 1996; 31: S23-S31.

Saba H, Munusamy S, MacMillan-Crow LA. Cold preservation mediated renal injury: involvement of mitochondrial oxidative stress. *Renal Failure*. 2008; 30:125-133.

Sabbagh R, Chawla A, Tisdale B, Kawan K, Chatterjee S, Kwiecien JM. Renal histopathology features according to various warm ischemia times in porcine laparoscopic and open surgery model. *Canadian Urological Association Journal*. 2011; 5: 40-43.

Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *American Journal of Physiology- Renal Physiology*. 2004; 287: F181-F187.

Salahudeen AK, May W. Reduction in cold ischemia time of renal allografts in the United States over the last decade. *Transplantation Proceedings*. 2008; 40: 1285-1289.

Santos EB, Koff WJ, Grezzana Filho TJM, De Rossi SD, Treis L, Bona SR, Pêgas KL, Katz B, Meyer FS, Marroni NAP, Corso CO. Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under various degrees of hypothermia in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2013; 28: 568-573.

Schlichting CL, Schareck WD, Weis M. Renal ischemia-reperfusion injury: new implications of dendritic cell-endothelial cell interactions. *Transplantation Proceedings*. 2006; 38: 679-673.

Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004; 114: 5-14.

Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2011; 7: 189-200.

Silveira M, Yoshida WB. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2004; 3: 367-378.

Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of Nutrition*. 2002; 21: 495-505.

Snoeijs MGJ, Bijnen AV, Swennen E, Haenen GRMM, Roberts LJ, Christiaans MHL, Peppelenbosch AG, Buurman WA, Heurn LWEV. Tubular epithelial injury and inflammation after ischemia and reperfusion in human kidney transplantation. *Annals of Surgery*. 2011; 253: 598-604.

Southard JH, Senzig KA, Belzer FO. Effects of hypothermia on canine kidney mitochondria. *Cryobiology*. 1980; 17: 148-153.

Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney International*. 2002; 62: 1539-1549.

Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney: inhibition by a soluble P-selectin ligand. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997; 99: 2682-2690.

Tatsioni A, Chung M, Sun Y, Kupelnick B, Lichtenstein AH, Perrone R, Chew P, Lau J, Bonis PA. Effects of fish oil supplementation on kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005; 16: 2462-2470.

Tirapelli LF, Barione DF, Trazzi BFM, Tirapelli DPC, Novas PC, Silva CS, Martinez M, Costa RS, Tucci S, Suaid Jr HJ, Cologna AJ, Martins ACP. Comparison of two models

for evaluation histopathology of experimental renal ischemia. *Transplantation Proceedings*. 2009; 41: 4083-4087.

Treckmann J, Nagelschmidt M, Minor T, Saner F, Saad S, Paul A. Function and quality of kidneys after cold storage, machine perfusion, or retrograde oxygen persufflation: results from a porcine autotransplantation model. *Cryobiology*. 2009; 59: 19-23.

Vaden SL. Renal biopsy: methods and interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2004; 34: 887-908.

Van der Vliet JA, Warlé MC, Cheung CLS, Teerenstra S, Hoitsma AJ. Influence of prolonged cold ischemia in renal transplantation. *Clinical Transplantation*. 2011; 25: E612-E616.

Waitzberg DL. Ômega-3: o que existe de concreto? *Nutritotal*, 2009. Disponível em: <<http://www.nutritotal.com.br/publicacoes/files/644--MonografiaOmega3.pdf>>. Acessado em: julho 2012.

Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Barden A, Watts GF, Beilin LJ. Effects of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on platelet, fibrinolytic and vascular function in hypertensive type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2003; 166: 85-93.

Yun Y, Duan WG, Chen P, Wu HX, Shen ZQ, Qian ZY, Wang DH. Ischemic postconditioning modified renal oxidative stress and lipid peroxidation caused by ischemic reperfusion injury in rats. *Transplantation Proceedings*. 2009; 41: 3597-3602.

Yurdakul T, Kulaksizoglu H, Pişkin MM, Avunduk MC, Ertemli E, Barişkaner H, Büyükbaş S, Kocabas V. Combination antioxidant effect of α -tocoferol and erdosteine in ischemia-reperfusion injury in rat model. *International Urology and Nephrology*. 2010; 42: 647-655.

Zhan C, Sindhu RK, Pang J, Ehdaie A, Vaziri ND. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *Journal of Hypertension*. 2004; 22: 2025-2033.

APÊNDICE A - TABULAÇÃO DOS ESCORES DE LESÃO HISTOPATOLÓGICA TUBULAR NOS GRUPOS G2 E G3

G2 - Não Suplementados								
Animal	Critério	Vacuolização	Necrose tubular	Descolamento	Dilatação	Mat eosinofílico	Inflamação	Congestão
R1		5	4	5	1	2	1	5
R2		3	3	5	1	3	1	5
R3		4	3	3	1	3	1	1
R4		4	4	2	1	3	1	1
R5		5	3	4	1	5	1	5
R6		5	4	3	1	4	1	4
R7		4	4	2	1	5	1	5
R8		4	3	3	1	5	1	3
R9		5	3	5	1	5	1	4
R10		5	4	5	1	5	1	4

Legenda: 1 – nenhuma anormalidade; 2 – lesão afetando 10% ou menos do rim; 3 – lesão afetando 25% do rim; 4 – lesão afetando 50% do rim; 5 – lesão afetando 75% ou mais do rim.

**APÊNDICE A - TABULAÇÃO DOS ESCORES DE LESÃO HISTOPATOLÓGICA TUBULAR NOS GRUPOS G2 E G3
(continuação)**

		G3 - Suplementados						
Animal	Critério	Vacuolização	Necrose tubular	Descolamento	Dilatação	Mat eosinofílico	Inflamação	Congestão
R1		3	4	4	1	3	1	5
R2		3	5	3	1	3	1	4
R3		3	3	3	1	4	1	5
R4		3	3	5	1	3	1	5
R5		3	5	5	1	4	1	5
R6		4	3	5	1	4	1	5
R7		4	3	4	1	3	1	4
R8		5	3	3	1	4	1	2
R9		4	2	2	1	5	1	2
R10		5	3	2	1	4	1	1
R11		3	3	2	1	3	1	5
R12		5	3	2	1	4	1	4

Legenda: 1 – nenhuma anormalidade; 2 – lesão afetando 10% ou menos do rim; 3 – lesão afetando 25% do rim; 4 – lesão afetando 50% do rim; 5 – lesão afetando 75% ou mais do rim.

APÊNDICE B – VALORES DE CATALASE EM $\mu\text{mol/g}$ TECIDO NOS GRUPOS: CONTROLE, SUPLEMENTADOS E NÃO SUPLEMENTADOS

Controle	Suplementados	Não Suplementados
8,76382	24,7727	56,1659
16,35	29,7273	40,4536
6,88421	26,6751	59,1855
6,7772	23,7339	104,505
15,8958	17,9307	57,1456
10,381	38,8609	69,3636
13,4845	28,9289	39,7244
14,2617	33,8641	30,2178
	38,5354	40,4536
	26,8473	34,8402
		48,5545
		53,9604

APÊNDICE C – VALORES DE GLUTATIONA PEROXIDASE EM nmol/mg DE TECIDO NOS GRUPOS: CONTROLE, SUPLEMENTADOS E NÃO SUPLEMENTADOS

Controle	Suplementados	Não Suplementados
17,4966	23,1311	26,4325
19,5518	24,105	30,9251
20,8628	25,3142	28,1164
23,5915	22,9794	25,1266
17,5766	22,7253	27,0434
21,54	22,5912	35,4406
19,3282	24,8793	29,7593
21,0262	25,7432	31,5566
	27,3244	32,7618
	25,5959	35,4665
		26,7833
		27,3137

APÊNDICE D – VALORES DE SUPERÓXIDO DISMUTASE EM nmol/mg DE TECIDO NOS GRUPOS: CONTROLE, SUPLEMENTADOS E NÃO SUPLEMENTADOS

Controle	Suplementados	Não Suplementados
4,17044	2,1513	2,95458
4,01627	2,80275	2,83477
3,75401	2,23606	2,72974
4,23101	2,02937	2,88631
3,95794	2,13543	2,84761
4,32056	2,39107	2,86167
4,53463	2,36943	2,41457
4,20519	2,71817	2,6565
	2,81117	2,45511
	2,74193	2,75467
		2,6058
		2,871

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA PESQUISA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 18 de outubro de 2012.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 742 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação do efeito da suplementação de ômega 3 em rins submetidos a isquemia fria

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Juliany Gomes Quitzan

EQUIPE DE PESQUISA:

Juliany Gomes Quitzan, Fernando Meyer, Patrícia Erdmann, Gabrielle Poltozi, Luciano Jose Eigio Isaka

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária / Medicina Veterinária

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Rato Branco</i>	Macho	Indeterminado	C	34

O colegiado do CEUA em reunião no dia 18/10/2012, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.


Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser



mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Prof^a Grazianda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais



ANEXO B - COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE UTILIZADO NO ESTUDO

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
Porção de 4,2 g (3 cápsulas)		
Quantidade por porção		% VD*
Valor Energético	30 kcal = 126 kj	2%
Gorduras totais	3,0 g, das quais	5%
Gorduras saturadas	0g	0%
Gorduras trans	0g	0%
Gorduras monoinsaturadas	0g	0%
Gorduras poliinsaturadas	3,0 g, das quais	0%
Ac. Eicosapentanóico (EPA)	0,54g	--
Ac. Docosahexanóico (DHA)	0,36g	--
Colesterol	0mg	0%
"Não contém quantidade significativa de carboidratos, proteínas, fibra alimentar e sódio."		
* Valores diários de referência com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kj. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.		