

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

**PATRÍCIA REGINA ERDMANN MOSKO**

**IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE RICO EM ÁCIDO GRAXO  
POLIINSATURADO ÔMEGA 3 SOBRE A FUNÇÃO E MORFOLOGIA RENAL DE  
RATOS WISTAR SUBMETIDOS À ISQUEMIA QUENTE**

*(Impact of oil fish rich in polyunsaturated fatty acids omega 3 supplementation on renal  
function and morphology in rats wistar submitted to warm ischemia)*

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS**

**2013**

**PATRICIA REGINA ERDMANN MOSKO**

**IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE RICO EM ÁCIDO GRAXO  
POLIINSATURADO ÔMEGA 3 SOBRE A FUNÇÃO E MORFOLOGIA RENAL DE  
RATOS WISTAR SUBMETIDOS À ISQUEMIA QUENTE**

*(Impact of oil fish rich in polyunsaturated fatty acids omega 3 supplementation on renal  
function and morphology in rats wistar submitted to warm ischemia)*

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: Profa. Dra. Juliany Gomes Quitzan

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Meyer

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS**

**2013**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIB/PUCPR  
Biblioteca Central

M897i  
2013 Mosko, Patricia Regina Erdmann  
Impacto da suplementação de óleo de peixe rico em ácido graxo poliinsaturado ômega 3 sobre a função e morfologia de ratos wistar submetidos a isquemia quente / Patricia Regina Erdmann Mosko ; orientadora, Juliany Gomes Quitzan ; co-orientador, Fernando Meyer. -- 2013  
67 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais, 2013.

Bibliografia: f. [51]-62

1. Veterinária. 2. Ácidos graxos Omega. 3. Rins – Doenças. 4. Reperusão (Fisiologia). 5. Isquemia. 6. Histopatologia veterinária. I. Quitzan, Juliany Gomes. II. Meyer, Fernando. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDD 20. ed. – 636.089



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

**ATA Nº 0040 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA PATRÍCIA REGINA  
ERDMANN MOSKO**

Aos vinte e cinco dias do mês de março do ano de dois mil e treze, às 8:30 horas, realizou-se no anfiteatro do Mestrado em Ciência Animal da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada na Rodovia 376 – Km 14 – São José dos Pinhais - PR, a sessão pública de defesa da Dissertação da Mestranda Patrícia Regina Erdmann Mosko, intitulada: **“SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE RICO EM ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO ÔMEGA 3 NÃO CONFERE NEFROPROTEÇÃO EM RINS SUBMETIDOS À ISQUEMIA QUENTE”**. 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. Juliany Gomes Quitzan, auxiliada pelos Professores Doutores Paulo Roberto Kawano (UNESP) e Ricardo Fernandez Perez (UFPR). 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. Juliany Gomes Quitzan (Presidente)

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano (UNESP)

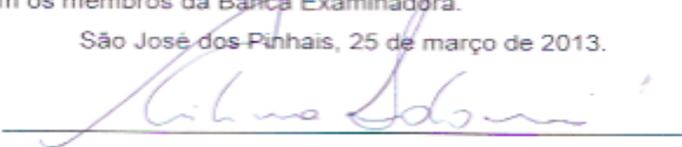
Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez (UFPR)

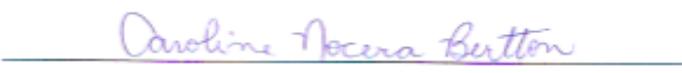
Assinatura

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, 25 de março de 2013.

  
Profa. Dra. Cristina Santos Sotomaior

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

  
Caroline Nocera Bertton

Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

## SUMÁRIO

	Página
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	vii
<b>FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....</b>	viii
<b>RESUMO GERAL.....</b>	ix
<b>ABSTRACT.....</b>	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	xi
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	xiii
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	xvi
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	1
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	4
2.1 INTRODUÇÃO.....	4
2.2 A ISQUEMIA RENAL.....	5
<b>2.2.1 Lesão endotelial.....</b>	5
<b>2.2.2 Lesão epitelial.....</b>	7
<b>2.2.3 O processo inflamatório.....</b>	8
2.3 A REPERFUSÃO RENAL.....	10
2.4 ALTERAÇÕES TISSULARES À HISTOPATOLOGIA.....	12
2.5 INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA.....	13
2.6 ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO ÔMEGA 3 E A DOENÇA RENAL..	17
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>3 IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE RICO EM ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO ÔMEGA 3 SOBRE A FUNÇÃO E MORFOLOGIA RENAL DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À ISQUEMIA QUENTE.....</b>	23
Resumo.....	23
Abstract.....	24
3.1 INTRODUÇÃO.....	26
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28

<b>3.2.1 Os animais.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.2 O óleo de peixe.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.3 O procedimento cirúrgico.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.4 Coletas de materiais biológicos.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.5 Eutanásia do animais.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.6 Determinação da IRA.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.7 Análise histopatológica.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.8 Análise estatística.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.1 Creatinina plasmática.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.2 Análise histopatológica.....</b>	<b>45</b>
<b>3.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>4 CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>65</b>

*À minha Mãe Célia, cujo coração não pode ser dimensionado. Emanava amor e fé em cada gesto e em cada palavra. Meu amor é pleno de admiração, transformado em adoração por ela e por tudo que representa.*

*Ao meu pai Gilson. Um homem que não conhece obstáculos. Implacável contra os problemas, é sem dúvida, o grande herói de minha vida. Sua força é sim capaz de mover montanhas para defender e cuidar de sua família. Sua vida, sua história são grandes exemplos à serem seguidos por mim e por todos que o cercam.*

*Ao meu marido José Carlos, presente enviado por Deus. É capaz de transformar minha vida todos os dias, dando-a razão e sentido. A faz simplesmente... completa.*

## AGRADECIMENTOS

A realização de nenhum trabalho é possível sem o auxílio e colaboração de outras pessoas. Deus nos mostra e nos põe à prova cada dia, fazendo-nos enxergar a importância dos relacionamentos, da atenção ao próximo e de seguir suas leis de amor e caridade.

A realização deste trabalho, sua conclusão e seu êxito somente foram possíveis devido à colaboração de diversas pessoas. Cada uma à sua maneira, foram igualmente importantes.

Gostaria de ressaltar meus agradecimentos:

À Deus e aos animais;

Ao grupo de pesquisa formado: Gabrielle Vargas, Luciano Isaka, Hanae Fontana, Henrique Passebom, Lais Prigol, Maiara Radigonda e Prof Dr Fernando Meyer;

Ao auxiliar de laboratório Misael Gomes Barbosa, pelos ensinamentos técnicos e de humildade;

À Profa Dra Cristina Sotomaior e à Caroline Nocera Bertton pela confiança e preciosos ensinamentos;

Aos Professores das bancas de qualificação e defesa, que contribuíram de forma polida, pontual e importante para lapidação deste trabalho: Profa Dra Cláudia Pimpão, Prof Dr Luiz Cláudio Fernandes, Prof Dr Paulo Kawano e Prof Dr Ricardo Fernandez.

Aos amigos que deram suporte, também suportaram e muito me incentivaram neste período: Kelly e Carlos, Rebeca e Júnior.

E em especial à minha orientadora, Profa Dra Juliany Gomes Quitzan, que realmente me fez crescer cientificamente, mostrando-me que esta etapa poderia sim ter fim e um fim pleno de satisfação em cumprir este dever. Seu exemplo estará sempre guardado comigo. Obrigada.

## **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 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 isquemia quente renal é uma técnica utilizada nos transplantes renais intervivos e em outras técnicas cirúrgicas dentro da urologia, incluindo nefrectomia parcial. O tempo de isquemia renal prolongado bem como os danos ligados à reperfusão, estão associados à lesões renais morfo-funcionais agudas, potencialmente permanentes, desenvolvimento de insuficiência renal aguda e rejeição do órgão transplantado. O uso de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 vêm sendo amplamente estudado em diversas doenças agudas e crônicas devido às suas propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, antifibróticas, vasodilatadoras e anti-trombogênicas. Objetivou-se neste estudo comparar a função renal e as alterações histopatológicas renais em ratos wistar submetidos à isquemia quente por 30 minutos seguida de nefrectomia contralateral em grupo controle (não suplementado) com grupos suplementados, em diferentes tempos pós cirúrgicos (24 horas e 30 dias). Observou-se que os valores de creatinina plasmática pós operatória apresentaram-se compatíveis com insuficiência renal aguda em todos os grupos, no período de 24 horas; mas apenas os animais suplementados apresentaram elevação dos valores basais com diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Ainda, o grupo suplementado com óleo de peixe rico em ácido graxo poliinsaturado ômega 3 no período pós operatório, apresentou valores de creatinina plasmática superiores aos do grupo controle no pós operatório de 30 dias ( $p < 0,05$ ). À histopatologia avaliaram-se lesões de vacuolização apical celular, necrose tubular, descolamento, dilatação tubular, inflamação e presença de material eosinofílico nas células tubulares renais, conferindo-se um escore de lesão à cada parâmetro conforme critérios de Goujon et al (1999). Não observou-se diferença estatística ( $p < 0,05$ ) nos escores de lesão histopatológica entre todos os rins submetidos à isquemia, tanto nos grupos suplementados quanto os não suplementados e entre os rins não submetidos à isquemia; contudo, os maiores escores de lesões foram encontrados nos rins que sofreram a isquemia quente tanto no período 24 horas quanto 30 dias. Conclui-se que o uso de ácido graxo poliinsaturado ômega 3, neste estudo, não conferiu nefroproteção - funcional e morfológica - ao insulto de isquemia quente e reperfusão.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos poliinsaturados ômega 3. Renoproteção. Isquemia quente. Reperfusão. Histopatologia renal.

## ABSTRACT

The warm renal ischemia is a technique used in living kidney transplantation and other surgical techniques in urology, including partial nephrectomy. The prolonged renal ischemia time and damage associated with reperfusion are associated with morphological and functional renal injury, potentially permanent, acute onset kidney failure and graft loss. The use of omega-3 polyunsaturated fatty acids have been extensively studied in various acute and chronic diseases due to its anti-inflammatory, antioxidant, antifibrotic, vasodilatory and anti-thrombogenic effects. The aim of this study was to compare the renal function and renal histopathological changes in Wistar rats submitted to warm ischemia for 30 min followed by contralateral nephrectomy in the control group (without supplemented) with supplemented groups with fish oil rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids, at different post surgical times (24 hours and 30 days). It was observed that the values of postoperative serum creatinine were compatible with acute renal failure in all groups at 24 hours, but only supplemented animals showed an increase from baseline values with statistical difference ( $p < 0.05$ ). In addition, plasma creatinine values were higher in the group supplemented with fish oil rich in omega-3 polyunsaturated fatty acid during the postoperative period than the control group at 30 days postoperatively ( $p < 0.05$ ). Renal histopathology observed apical cytoplasm vacuolization, tubular necrosis, tubular detachment, tubular dilatation, inflammation and eosinophilic material presence in the renal tubular cells, was graded in scores related with the degree of injury to each parameter, following Goujon et al. (1999) criteria. No statistical difference was observed ( $p < 0.05$ ) in histological injury scores between all kidneys submitted to warm ischemia in both groups (supplemented and non supplemented) and kidneys not submitted to ischemia; however, the higher scores lesions were found in kidneys that were submitted to warm ischemia both during 24 hours for 30 days. We conclude that the use of omega-3 polyunsaturated fatty acid in this study, did not confer renoprotection - functional and morphological – to the insult of warm ischemia and reperfusion.

**Keywords:** Omega-3 polyunsaturated fatty acids. Renoprotection. Warm ischemia. Reperfusion. Renal histopathology.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina difosfato
AGPI	Ácido Graxo Poliinsaturado
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
DCs	<i>Dendritic cells</i> - Células dendríticas
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i> - Ácido Docosahexaenoico
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxiribonucleico
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i> - Fatores de relaxamento derivados do endotélio
EPA	<i>Eicosapentaenoic acid</i> - Ácido Eicosapentaenoico
GTP	Guanosina trifosfato
HDL	<i>High density lipoprotein</i> – Lipoproteína de alta densidade
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i> - Fator induzido pela hipóxia
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> – molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
IRA	Insuficiência ou Injúria renal aguda
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> – lipoproteína de baixa densidade
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i> – proteína quimiotática de monócitos
mmHg	Milímetros de mercúrio
NADPH	Nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato
NKT	<i>Natural killer cell T</i> – Células natural killer T
NTA	Necrose tubular aguda
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radicais superóxidos
OH <sup>-</sup>	Radicais livres de hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLA	<i>Phospholipase</i> – Fosfolipase

PG	Prostaglandina
RIFLE	<i>Risk, Injury, Failure, Loss and End-Stage</i> – Sistema de classificação de IRA
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> – Espécies reativas de oxigênio
TFG	Taxa de filtração glomerular
TLRs	<i>Toll-like receptors</i> – receptores transmembrana
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> – Fator de necrose tumoral
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> – lipoproteína de muito baixa densidade
VR	Valor de referência
UTI	Unidade de terapia intensiva

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Representação esquemática da estrutura química dos ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados.....	18
Figura 2. Metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados. Enzimas desaturases $\Delta 5$ , $\Delta 6$ , $\Delta 9$ , $\Delta 12$ e $\Delta 15$ ; COX: enzima ciclooxigenase; LOX: enzima lipooxigenase; PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos; TX: tromboxanos; LX: lipoxinas; HETE: ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos; HPETE: ácidos hidroxiperoxi-eicosatetraenóicos.....	22
Figura 3. Dissecção do hilo renal esquerdo para posterior clampeamento.....	30
Figura 4. Clamp vascular tipo <i>bulldog</i> utilizado para oclusão do hilo renal por 30 minutos.....	31
Figura 5. Porcentagem de animais que apresentaram aumento de creatinina plasmática superior a $0,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ , compatível com IRA e de animais que apresentaram aumento de creatinina plasmática inferior a $0,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ no período de 24 horas pós operatório, dos grupos controle, G1 e G3 (n=18) e 30 dias nos grupos controle, G1, G2 e G3 (n=24).....	38
Figura 6. Variação (em %) observada nas concentrações plasmáticas de creatinina pós e pré operatória no momento de 24 horas nos grupos controle, G1 e G3 (n=18). Cada ponto no gráfico corresponde a um indivíduo.....	38

Figura 7.	Concentrações plasmáticas de creatinina ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) no momento pré-operatório imediato e 24 horas após 30 minutos de isquemia quente em ratos Wistar pertencentes ao Grupo Controle e G3. Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....	39
Figura 8.	Concentrações plasmáticas de creatinina ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) no momento pré-operatório imediato e 30 dias após 30 minutos de isquemia quente em ratos Wistar, pertencentes aos grupos G1, G2 e G3. Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....	41
Figura 9.	Concentrações plasmáticas de creatinina ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) no momento 30 dias após técnica de isquemia quente renal por 30 minutos, entre os grupos GC, G1, G2 e G3. Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. *P=0,0283 entre GC e G2.....	43
Figura 10.	Fotomicrografia de rins de ratos wistar submetidos à isquemia renal quente por 30 minutos. <b>A</b> – Dilatação tubular de diversas magnitudes, perda da bordadura em escova (HE 100x); <b>B</b> – Infiltrados inflamatórios mononucleares (setas) (HE 100x).....	47
Figura 11.	Fotomicrografia de rins de ratos wistar submetidos à isquemia renal quente por 30 minutos. <b>C</b> – Necrose tubular aguda, destaca-se núcleo picnótico (seta cheia), células necróticas se projetando para a luz do túbulo (seta pontilhada), dilatação e obstrução tubular (HE 400x); <b>D</b> – Acúmulo de material eosinofílico na luz tubular (setas) (HE 200x).....	48
Figura 12.	Fotomicrografia de rins de ratos wistar submetidos à isquemia renal quente por 30 minutos. <b>E</b> – Intensa vacuolização das células tubulares, desarranjo celular e obstrução da luz do túbulo (HE 400x).....	48

Figura 13. Pontuação global dos escores de lesão histopatológica em cada grupo, no momento 30 dias pós operatório, considerando-se N – grupo normal (rim direito sem isquemia e sem suplementação), GC – grupo controle (rim esquerdo submetido à isquemia quente por 30 minutos, sem suplementação de AGPI n-3), G1 (rim esquerdo submetido à isquemia quente por 30 minutos, com suplementação de AGPI n-3 por 30 dias pré operatório) e G3 (rim esquerdo submetido à isquemia quente por 30 minutos, com suplementação de AGPI n-3 por 30 dias pré e 30 dias pós operatório)..... 50

## LISTA DE QUADROS

	<b>Página</b>
Quadro 1. Sistema de classificação RIFLE para pacientes com IRA.....	14
Quadro 2. Delineamento do estudo, dividindo-se os animais por grupo, separados conforme o programa de suplementação a ser estabelecido e os períodos de eutanásia pós-operatória.....	28
Quadro 3. Tabulação das médias e dos resultados das análises estatísticas considerando-se as concentrações plasmáticas de creatinina pré e pós operatórios em cada grupo analisado. * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ..	41

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

A preservação da função renal em procedimentos intervencionistas é um ponto de constante aprimoramento dentro da nefrologia e urologia. Tanto na medicina humana quanto na veterinária, algumas técnicas cirúrgicas como nefrectomia parcial e nefrotomia requerem a interrupção momentânea do fluxo de sangue renal, conhecida como isquemia quente. De forma geral, para estes procedimentos, há indicação de oclusão temporária do fluxo sanguíneo usando-se a técnica de clampeamento manual intermitente ou com uso de clamps vasculares atraumáticos colocados no hilo renal, com objetivo de reduzir a hemorragia transoperatória (DERAJAVAN, 2006; ADIN, SCANSEN, 2011; HOLT, 2011).

A lesão isquêmica renal pode levar a danos celulares e moleculares, com desorganização dos mecanismos de sinalização celular e conseqüentemente desorganização estrutural, chamada de necrose tubular aguda. Sabe-se hoje que quando a circulação é reestabelecida ocorre a reperfusão do órgão com sangue rico em radicais livres de oxigênio, apontados como mediadores de lesão tecidual em vários órgãos, como intestino delgado, pulmões, coração e rins. A restauração do fluxo sanguíneo renal, mesmo que rápido, pode não ser suficiente para reestabelecer de imediato a filtração glomerular. Isto porque a reperfusão pode agravar ainda mais a lesão original devido a geração de radicais livres e/ou causando modificações do meio intracelular, como alterações do cálcio citosólico e do pH intracelular. Além disso, a reorganização celular com o reestabelecimento de suas funções podem levar dias a semanas para serem normalizadas (BAKER et al., 1985; LARANJA et al., 1997).

Portanto, apesar do esforço em manter a integridade morfo-funcional renal, alterações em decorrência da lesão de isquemia e reperfusão invariavelmente ocorrem.

Conhecidas as razões pelas quais a isquemia e a reperfusão podem ser deletérias aos rins, destaca-se a preocupação com as lesões oriundas da isquemia quente realizada no rim de doador vivo. Diferentes pesquisadores mostram que quanto maior o tempo de isquemia quente (acima de 40-45 minutos), maior a ocorrência de comprometimento funcional do órgão transplantado e o risco do paciente apresentar alteração da função renal no pós-operatório (SIMMONS et al., 2011; CASSINI, 2012; HELLEGERING et al., 2012).

Ainda, a preocupação com a injúria da isquemia e reperfusão está relacionada aos índices de desenvolvimento de insuficiência renal aguda (ZORZENON et al., 2008, THOMPSON et al., 2012) e, sobretudo, à preocupação com a falha de função renal após transplante renal inter-vivos a curto e a longo prazo (HELLEGERING et al., 2012).

Segundo Vaidya et al. (2007), dos pacientes que sobrevivem à IRA, 13 a 41% podem tornar-se diálise-dependentes, sendo que a expectativa de vida chega a 5 anos em 50% destes pacientes. Além do aspecto médico e psicológico, é necessário considerar o custo do tratamento da IRA para os cofres públicos. Segundo dados do ministério da saúde, os gastos com terapias dialíticas chegaram a 2 bilhões de reais no Brasil, somente no ano de 2012.

Assim, o uso de terapias que limitem a ativação de células inflamatórias bem como o dano tecidual durante isquemia poderiam diminuir os eventos desencadeados pela isquemia/reperfusão e prevenir as injúrias renais. Diversos estudos têm demonstrado como benéfica a suplementação de ácido graxo poliinsaturado ômega 3 devido à sua ação antiinflamatória, antioxidante e possivelmente nefroprotetora, tanto em processos agudos – lesão isquêmica (HASSAN, GRONERT, 2009), quanto em processos crônicos – doenças renais pré-existentes e rins de pacientes idosos (FASSET et al., 2010).

Em situações de uso de ômega 3 em maiores proporções nas dietas, observa-se que há substituição parcial do ômega 6 por ômega 3 na membrana plasmática celular de eritrócitos, plaquetas, linfócitos, monócitos, células endoteliais e hepatócitos, relacionados ao efeito protetor em condições inflamatórias e autoimunes. Há ainda,

ação inibitória na produção de eicosanóides e citocinas pró-inflamatórias em outros tecidos, desta forma minimizando as lesões decorrentes de uma resposta inflamatória exacerbada, especialmente em doenças inflamatórias crônicas como a doença inflamatória intestinal e a artrite reumatóide (CALDER et al., 1994; WAITZBERG, 2009).

O objetivo geral deste estudo é avaliar a lesão de isquemia e reperfusão em ratos wistar (*Rattus norvegicus*) submetidos à isquemia quente renal unilateral por 30 minutos, verificando se existem diferenças histológicas e funcionais entre grupos de animais suplementados com óleo de peixe rico em ácido graxo poliinsaturado ômega 3 (AGPI n-3) e animais não suplementados, considerando-se como hipótese que há nefroproteção morfo-funcional pelo uso de AGPI n-3 nos animais submetidos à isquemia renal quente.

Uma vez que já existem trabalhos que demonstram a eficácia do uso do ômega 3 como nutracêutico cardioprotetor, anti-inflamatório e anti-fibrótico, acredita-se que seu uso possa também ser indicado profilaticamente para pacientes que serão submetidos à procedimentos cirúrgicos renais diversos, buscando-se melhor recuperação tissular renal, com menor ou mínima interferência funcional, especialmente evitando-se a IRA, uma vez que esta não pode ser estudada apenas como uma enfermidade a ser tratada, mas sobretudo a ser prevenida (NOLAN, ANDERSON, 1998; BONVENTRE, YANG, 2011).

## CAPÍTULO 2

### 2 REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1 INTRODUÇÃO

Os rins recebem de 20 a 25% do débito cardíaco para realizar as funções de excreção e manutenção do equilíbrio hidro-eletrolítico, contudo consome apenas 10% do oxigênio disponível. O córtex renal recebe 90% do fluxo sanguíneo, e, dos 10% de oxigênio disponível utiliza apenas 20%. Os 80% de oxigênio restantes são destinados à região medular externa, onde estão localizados os segmentos do néfron que mais utilizam mecanismos de transporte celular ativos: o túbulo proximal e a porção espessa da alça de henle. Portanto, a região medular externa, por receber apenas 10% do fluxo sanguíneo que chega aos rins, e por ser a região mais metabolicamente ativa, vive constantemente à beira da hipóxia, o que aumenta a susceptibilidade à depleção de energia durante a isquemia (YU et al., 2002; BRONW, 2011).

Os rins apresentam capacidade de autoregulação da taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal, independente da pressão arterial ou do volume sanguíneo circulante, utilizando-se de 2 mecanismos: (1) reflexo miogênico e (2) retroalimentação tubular. Estes mecanismos são garantidos pela capacidade de vasoconstricção e vasodilatação apresentadas pelas arteríolas aferentes e eferentes e pela ação de substâncias locais, como a renina e o óxido nítrico (GUYTON, 1996; YU et al., 2002). O fluxo sanguíneo renal é que mantém a taxa de filtração glomerular, ou seja, o quanto de sangue é filtrado. A autoregulação mantém-se mesmo com variações da pressão arterial sistêmica de 70 a 170 mmHg. Com valores de pressão superiores a 170 mmHg, ocorre aumento da taxa de filtração glomerular e aumento da produção de urina. Com valores inferiores a 70 mmHg a taxa de filtração glomerular declina, assim como a produção de urina (GUYTON, 1996; RIESER, 2005).

## 2.2 ISQUEMIA RENAL

A isquemia realizada em algumas situações cirúrgicas como nefrectomia parcial, nefrotomia e nas nefrectomia totais para transplante inter-vivos tem como consequência importante redução na hemodinâmica renal e é conhecida como isquemia quente (DEJAVARAN, 2006). A oclusão temporária do fluxo sanguíneo usando-se a técnica de clampeamento manual ou com uso de clamps vasculares atraumáticos colocados no pedículo renal ou na artéria renal objetiva reduzir a hemorragia transoperatória (ADIN, SCANSEN, 2011; HOLT, 2011).

O clampeamento da artéria renal de cães pode levar à lesão tissular isquêmica com declínio de 20 a 40% da taxa de filtração glomerular (TFG) em até 6 semanas pós procedimento de nefrotomia, com melhora de até 176% da TFG após 4 semanas do procedimento (ADIN, SCANSEN, 2011). Atribui-se a este procedimento causa pré-renal e renal intrínseca de lesão aguda e potencialmente permanente (NOLAN, ANDERSON, 1998).

A isquemia renal resulta em hipóxia e na interrupção da chegada de nutrientes, localizada ou generalizada, com ineficiente ou ausente remoção de produtos oriundos do metabolismo celular. Este desbalanço pode levar à injúria epitelial e morte celular por necrose ou apoptose. Na dependência da severidade da isquemia, do tempo decorrido e da porção tissular envolvida, há perda funcional da homeostase hidroeletrolítica, redução da taxa de filtração e da excreção de produtos do metabolismo orgânico (BONVENTRE, YANG, 2011).

As lesões celulares são multifatoriais e resultam de complexa cascata de eventos fisiopatológicos celulares, que serão descritos a seguir.

### 2.2.1 Lesão endotelial

O endotélio e a musculatura lisa arteriolar são muito importantes para manter o tônus vascular, o fluxo sanguíneo renal e a função leucocitária. Lesões endoteliais nas arteríolas aferentes e eferentes podem levar à intensificação do processo de

vasoconstrição devido ao aumento da produção de endotelina-1, angiotensina II, tromboxanos A<sub>2</sub>, prostaglandinas H<sub>2</sub>, leucotrienos C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub> e adenosina, além da estimulação simpática, o que influencia os mecanismos de autoregulação e mantém o tufo capilar glomerular isquêmico. Há ainda redução da resposta de vasodilatação à ação da acetilcolina, bradicininas e ao óxido nítrico, além da redução da produção de substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico entre outras (BONVENTRE, 1993; BONVENTRE, YANG, 2011).

A depleção de ATP mitocondrial durante o evento isquêmico resulta no aumento da produção de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-32 e endotelina, gerando como resultado a adesão leucocitária no endotélio e a ativação de leucócitos, que são características da injúria renal isquêmica (BONVENTRE, YANG, 2011; COWGILL, LANGSTON, 2011).

A associação da vasoconstrição à oclusão de vasos pela adesão leucocitária ao endotélio e da ativação da cascata de coagulação resulta no comprometimento da microcirculação e isquemia regional, especialmente na medular externa. Com a redução/depleção de energia e a paralisação dos mecanismos de transporte ativo, especialmente na porção espessa da alça de henle, o mecanismo de retroalimentação tubuloglomerular fica comprometido; portanto, não há resposta da mácula densa à concentração de sódio na luz tubular, provocando redução da taxa de filtração glomerular (BONVENTRE, YANG, 2011; COWGILL, LANGSTON, 2011). Ou seja, a hipóxia é capaz de interferir nos dois mecanismos de auto-regulação da taxa de filtração glomerular: o reflexo miogênico e o de retroalimentação tubuloglomerular. A alteração no tônus vasomotor refletir-se-á então na distribuição de oxigênio aos segmentos tubulares. A redução da TFG poderá ser refletida pelo aumento da concentração sanguínea de creatinina, especialmente nos quadros de insuficiência renal aguda (IRA).

### 2.2.2 Lesão epitelial

As células tubulares do túbulo contornado proximal apresentam taxa metabólica constante e por este motivo apresentam alta necessidade de oxigênio. Nas células tubulares, durante um processo isquêmico ocorre a inibição da fosforilação oxidativa e diminuição na produção da adenosina trifosfato (ATP), prevalecendo o metabolismo anaeróbico, com aumento do lactato e fosfato inorgânico endocitoplasmático e diminuição do pH intracelular (SCHIER et al., 2004).

As células dos túbulos são altamente polarizadas e têm diferentes composições de lipídios e proteínas conforme a região apical ou basolateral. Após a lesão isquêmica, ocorrem importantes alterações no citoesqueleto destas células. Nas células normais dos túbulos os microfilamentos de actina encontram-se organizados como um denso citoesqueleto na porção apical celular. Diferentes tempos de isquemia resultam em ruptura do citoesqueleto devido à redistribuição da actina para o citosol e para a região perinuclear (LARANJA et al., 1997; DEVARAJAN, 2006), provocando perda de suas microvilosidades apicais (SCHIER et al., 2004).

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 realocação no túbulo proximal provoca aumento significativo de influxo de sódio. Este aumento de sódio será percebido pela mácula densa e provocará constrição da arteríola aferente, que levará a redução na TFG (SCHIER et al., 2004).

Com a localização errática da bomba NA-K-ATPase, as células perdem sua polaridade, resultando em alteração na movimentação de solutos. Há decréscimo da concentração de potássio, magnésio e fosfato intracelulares e aumento das concentrações de sódio, cloreto e cálcio, provocando edema celular. Sequencialmente, com a manutenção da depleção de ATP há a paralisação da atividade das bombas iônicas, dentre elas a bomba sódio-potássio ATPase, contribuindo para a gênese do edema e provocando a morte celular (BONVENTRE, 1997; RIESER, 2005; KERL, 2010).

Ainda com a isquemia, pode ocorrer a redistribuição das integrinas da membrana basal para a membrana apical das células tubulares, uma vez que estas glicoproteínas são responsáveis pela fixação celular na membrana basal, sua localização errática poderá levar à adesão a outras células tubulares, provocando obstrução tubular (SCHIER et al., 2004).

O desarranjo do citoesqueleto, associado ao edema pode provocar a ruptura da célula e morte. Os debris celulares formados podem causar obstrução do lúmen tubular o que contribui para formação de cilindros, aumento da pressão intra-tubular e redução da taxa de filtração glomerular neste túbulo individualmente, podendo até mesmo levar à perda da função definitiva (BONVENTRE, 1997; RIESER, 2005; KERL, 2010). Ainda, o edema celular provoca obstrução tubular e pode comprometer o fluxo sanguíneo nos capilares locais por congestão, provocando lesões isquêmicas adicionais nas circunjabências (BONVENTRE, 1993; FRANCHISCHETTI et al., 2010).

O excesso de cálcio intracelular leva a captação exacerbada de cálcio pelas mitocôndrias e edema destas organelas, prejudicando a fosforilação oxidativa (COWGILL, LANGSTON, 2011). O cálcio pode ser lesivo à célula por estimular ATPases do retículo endoplasmático edemaciado; desta forma, o gasto de energia e o consumo de ATP, ativam fosfolipases e proteases dependentes de cálcio, que levam à proteólise, ruptura de membrana e comprometimento adicional do citoesqueleto (LARANJA et al., 1997; COWGILL, LANGSTON, 2011).

### **2.2.3 O processo inflamatório**

Os danos tissulares são potencializados pela reação inflamatória estabelecida imediatamente à injúria, iniciando-se no endotélio vascular do tufo glomerular e estendendo-se aos capilares peritubulares (BONVENTRE, YANG, 2011). Esta resposta inflamatória ocorre por três mecanismos: a depleção de ATP, o aumento do fator induzido pela hipóxia (HIF) e aumento das espécies reativas de oxigênio. A depleção de ATP durante a isquemia renal provoca lesão mitocondrial, o que resulta no aumento da produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. Estas citocinas

ativam quimocinas que, por sua vez, atraem macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e linfócitos T (COWGILL, LANGSTON, 2011).

O dano endotelial ocorre por maior expressão de moléculas de adesão celular como a ICAM-1 e de receptores de superfície, levando a ativação de leucócitos, formação de microtrombos, obstrução dos capilares e vênulas pós capilares. Há ruptura da monocamada endotelial (por perda do glicocálix, quebra da actina do citoesqueleto e pelo estado inflamatório), com migração leucocitária para o interstício, que se expande devido ao grande número de células e edema (BONVENTRE, YANG, 2011).

Tanto a resposta imunológica inata quanto a adaptativa são importantes na patofisiologia da lesão isquêmica. A imunidade inata ativará neutrófilos e monócitos/macrófagos, células dendríticas imaturas (DCs), natural killers e células NKT. O componente adaptativo será ativado por antígenos específicos em horas a dias após a lesão, mediada pela maturação das DCs, apresentação de antígeno, proliferação de linfócitos T e ativação de linfócitos T e B (BONVENTRE, YANG, 2011).

Neutrófilos, monócitos/macrófagos, DCs e células T são importantes no processo de lesão isquêmica e reparação. Os neutrófilos acumulam-se no endotélio produzindo proteases, mieloperoxidases, espécies reativas de oxigênio e citocinas que provocarão aumento da permeabilidade vascular e redução da integridade endotelial e epitelial, agravando a injúria (SILVEIRA, YOSHIDA, 2004; FRANCISCETTI et al., 2010).

Os macrófagos e DCs maduros são ativados durante a injúria e deflagram a resposta imunológica adaptativa por apresentarem antígenos às células T, todos são importantes também na fase de recuperação. O sistema complemento contribui para a inflamação pós isquêmica pela ativação de via alternativa. É o sistema complemento, especialmente C3, que promove a maturação das DCs (BONVENTRE, YANG, 2011).

Existem muitos inibidores inflamatórios endógenos que limitam o dano renal após a isquemia, como a heme-oxigenase-1, proteínas de Tamm-Horsfall, resolvinas e protectinas D-1. Estas duas últimas derivam do ácido docosahexaenóico (DHA) oriundo

do ácido graxo poliinsaturado ômega 3. Foi observado que a administração de resolvinas e protectina D-1 em ratos resultou na redução do acúmulo leucocitário e na ativação de macrófagos, levando a redução das alterações morfo-funcionais e da fibrose pós-isquêmica (HASSAN, GRONERT, 2009).

### 2.3 A REPERFUSÃO RENAL

Uma vez que a resolução destas alterações é o reestabelecimento da perfusão tecidual, a reperfusão torna-se a medida terapêutica mais urgente. A reperfusão, por conceito é a readmissão de oxigênio ao local isquemiado. Esta circulação, pode provocar danos ainda maiores do que àqueles gerados pela isquemia (CASSINI, 2012).

A reperfusão portanto, promoverá a circulação de radicais livres de oxigênio formados durante o período isquêmico e no início da reperfusão e deflagrará uma complexa cascata de eventos que levam a lesões tissulares adicionais e ao acúmulo intracelular adicional de cálcio (EVORA et al., 1996).

Em condições fisiológicas, os radicais livres originam-se do metabolismo oxidativo microsomal e mitocondrial, auto-oxidação de catecolaminas, processos mediados pelo citocromo P-450 e das vias das lipooxigenases e ciclooxigenases (LARANJA et al., 1997).

Durante o evento isquêmico, o ATP reserva é degradado em adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e por fim adenosina, inosina e hipoxantina. A hipoxantina será convertida em xantina pela ação da enzima xantina oxidase com liberação de radicais superóxidos, na presença de cálcio. A enzima superóxido dismutase converte estes radicais livres de oxigênio em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) o qual será convertido na mais reativa espécie de oxigênio, o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (BOIM et al., 1996). Isto ocorre devido à disponibilidade aumentada do oxigênio durante a reperfusão, que será utilizado como acceptor final de elétrons, ao invés da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) – acceptor final de elétrons em situações fisiológicas (FRANCISCHETTI et al., 2010).

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) com os sistemas de desintoxicação provoca o estresse oxidativo. Quando a célula não é capaz de reestabelecer o equilíbrio natural, o acúmulo destes radicais pode culminar em alterações funcionais e morte celular por necrose ou apoptose (LENNON et al., 1991).

Os radicais livres causam peroxidação lipídica, desnaturação protéica e oxidação de ácidos nucléicos (LENNON et al., 1991). A peroxidação lipídica ocorre pela remoção de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno, formando um radical de carbono e este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado (um hidrocarboneto de cadeia aberta com dupla ligação entre os carbonos). Esta reação inicia uma cascata de reações bioquímicas via lipoxigenases, mieloperoxidases e ciclooxigenases que promoverão a formação de novos radicais livres, ativação da cascata inflamatória via ácido araquidônico, transtornos de permeabilidade celular, alterações tóxicas celulares e alterações no DNA (LIMA, ABDALLA, 2001).

O excesso de cálcio intracelular trazido pela reperfusão ativará proteases intracitoplasmáticas como a calpaína. Esta ativará enzimas lisossômicas que lesam diretamente as organelas e a enzima fosfolipase A2, que degrada o ácido araquidônico, dando origem aos mediadores da inflamação: leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina e os tromboxanos. Os leucotrienos podem ligar-se a receptores da membrana celular de neutrófilos levando à sua ativação e adesão e provocando vasoconstrição, piorando a isquemia. Os tromboxanos provocarão também vasoconstrição, agregação plaquetária e de neutrófilos, prejudicando a microcirculação (SILVEIRA, YOSHIDA, 2004; FRANCISCHETTI et al., 2010).

Os neutrófilos ativos passam a produzir espécies reativas de oxigênio nos vacúolos fagocitários e pela ação das mieloperoxidases, que produzirão hipoclorito a partir do peróxido de hidrogênio. As ROS e os produtos da reação de inflamação terão ação quimiotática, atraindo e ativando mais neutrófilos, que liberarão enzimas proteolíticas como elastases, hidrolases, mieloperoxidases e proteases, causando destruição tecidual e amplificando ainda mais a resposta inflamatória e a quimiotaxia (FRANCISCHETTI et al., 2010).

A manutenção prolongada do tempo de isquemia e reperfusão pode causar danos celulares de 3 tipos: lesão subletal, apoptose e necrose (COWGILL, LANGSTON, 2011) especialmente nas células tubulares dos segmentos renais localizados na medular externa (*pars recta* do túbulo proximal e alça de henle) (YU et al., 2002). Necrose tubular aguda (NTA) foi um termo amplamente utilizado para descrever este tipo de lesão isquêmica, contudo atualmente sabe-se que não é termo apropriado (COWGILL, LANGSTON, 2011), se inicia 24 horas após a isquemia e é agravada na fase de regeneração dos túbulos (CASSINI, 2012).

Os insultos podem levar tanto à ativação da apoptose quanto à necrose celular de forma simultânea, e em proporções diversas. Ambas são formas de morte celular, porém que ocorrem de forma diferente, e distinguí-las é fundamental; por este motivo, a análise histológica e a análise de marcadores bioquímicos é indicada (PADANILAM, 2003).

## 2.4 ALTERAÇÕES TISSULARES À HISTOPATOLOGIA

Os achados histopatológicos estão relacionados aos mecanismos de lesões celulares, principalmente nos túbulos. Sob microscopia óptica, normalmente os túbulos possuem membrana basal delgada, e estão separados uns dos outros por estroma intersticial discreto e com capilares. Nas lesões tubulares, de forma geral, busca-se avaliar a presença de cilindros, focos de degeneração, regeneração e necrose. O interstício deve ser avaliado quanto a presença de edema, fibrose, inflamação ou a combinação destes fatores (VADEN, 2004).

Histologicamente, os achados mais evidentes da isquemia são o edema, a vacuolização celular e, nas células do epitélio tubular proximal, as alterações na bordadura em escova, achatamento do epitélio tubular e descamação celular na luz do túbulo, provocando obstrução e dilatação. Os danos considerados irreversíveis são caracterizados por picnose nuclear, calcificações nucleares e ruptura da membrana plasmática, pois levam à morte celular por apoptose ou necrose, situações que não podem ser distinguidas apenas pela histopatologia (CASSINI, 2008).

Sabe-se que as alterações histológicas serão tanto mais significativas quanto maior for o tempo de isquemia seguido de reperfusão à que o órgão foi submetido. Estas alterações podem ser encontradas de 24 a 72 horas pós reperfusão (TIRAPELLI et al., 2009), especialmente nos túbulos contornados proximais, enquanto os glomérulos podem manter o aspecto histológico próximo ao normal (BAKER et al., 1985).

A análise histopatológica é indicada nos rins que passaram por isquemia quente, especialmente nos pacientes receptores em transplantes renais, com objetivo de diagnosticar duas grandes complicações inerentes ao procedimento: a necrose tubular aguda isquêmica e a rejeição, pois é o método diagnóstico mais sensível quando comparados à cintilografia e citologia por aspirado com agulha fina (TIRAPELLI et al., 2009).

A extensão das lesões de necrose celular desempenharão importante papel na patogênese da IRA pós isquemia e reperfusão.

## 2.5 INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA

O termo insuficiência renal aguda ou injúria renal aguda (IRA) representa uma gama de doenças associadas à lesão tissular aguda comumente caracterizada pela falência das funções metabólicas, excretórias e endócrinas renais. Esta condição pode ser clinicamente imperceptível em estágios precoces e pode culminar com a necessidade de terapias renais substitutivas, especialmente na medicina humana, e está associada à alta mortalidade e morbidade, tanto na medicina humana, quanto na veterinária (CASSINI, 2008; VAIDYA et al., 2008; COWGILL, LANGSTON, 2011).

O conceito de IRA pode ser definido como declínio abrupto da função renal, mensurado pelo aumento sanguíneo de creatinina, que ocorre de horas a semanas após a injúria, contudo em período inferior a 3 meses (BONVENTRE, YANG, 2011).

A IRA pode ser classificada conforme os mecanismos básicos que levam à disfunção: (1) IRA pré-renal; (2) IRA renal e, (3) IRA pós-renal. Quando o rim está

funcionalmente íntegro mas a perfusão sanguínea está reduzida a IRA é denominada pré-renal. Quando o tempo de isquemia é mantido, as células renais passam a sofrer e se lesionar com a depleção de ATP e por isso desenvolve-se a IRA renal ou também chamada de intrínseca. Cerca de 70 a 90% das IRAs renais decorrem de IRAs pré-renais. Na IRA pós-renal, o fluxo urinário é dificultado ou interrompido por obstrução ou ruptura mecânica das vias urinárias (YU et al., 2002).

A mensuração de creatinina sanguínea é a medida estimativa da taxa de filtração glomerular mais consagrada na avaliação da função renal. Contudo, tem mostrado uma série de limitações na avaliação precoce de lesões renais agudas, por isso é considerada como marcador insensível, não específico e que se altera tardiamente, ou seja, apenas após a lesão já ter se instalado. Porém, sua mensuração é rápida e de baixo custo, e seus valores estão diretamente ligados ao próprio conceito da IRA (VAIDYA et al., 2008; BONVENTRE, YANG, 2011).

Atualmente, têm-se buscado refinar a interpretação dos valores de creatinina e por este motivo criou-se uma nova escala de classificação denominada “RIFLE” (*Risk, Injury, Failure, Loss e End-stage*). Dentro desta nova classificação a IRA caracteriza-se por uma redução abrupta da função renal definida por aumento absoluto da creatinina sérica igual ou superior a  $0,3 \text{ mg.dL}^{-1}$  ou aumento de 150 a 200% do valor basal ou ainda, por redução do fluxo urinário, documentado como oligúria, menor de  $0,5 \text{ mL.Kg}^{-1}$  por hora por mais de seis horas, em estado de hidratação adequado, conforme descrito no quadro 1 a seguir (VAIDYA et al., 2008).

Quadro 1: Sistema de classificação RIFLE para pacientes com IRA

Estágio	Creatinina Sérica
<b>1 – Risco “Risk”</b>	Aumento de $\geq 0,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ ou $\geq 150$ a 200% do valor basal
<b>2 – Injúria “Injury”</b>	Aumento de 200-300% do valor basal
<b>3 – Falência “Failure”</b>	Aumento $> 300\%$ do valor basal
<b>Perda “Loss”</b>	IRA persistente, completa perda de função por 4 semanas
<b>Estágio Final “End-Stage”</b>	Perda da função renal por 3 meses

Fonte: Adaptado de Vaidya et al., 2008

A importância do diagnóstico precoce e a prevenção do estabelecimento da IRA é dada pela frequência de ocorrência da doença nos hospitais. A IRA ocorre em 5 a 7% do total de pacientes hospitalizados; contudo, pode chegar a 40% nas unidades de terapia intensiva, apresentando de 50 a 80% de mortalidade, dependendo da comorbidade apresentada pelo paciente (ZORZENON et al., 2008; KERL, 2010).

A IRA está associada também com maior tempo de hospitalização em unidade de terapia intensiva (UTI) (entre 10 e 15 dias) quando comparados aos pacientes com função renal normal (entre 5 e 10 dias), com o alto índice de mortalidade durante internamento (40% maior, quando comparado com pacientes internados por motivos diversos na UTI), menor tempo de sobrevivência após alta hospitalar (ZORZENON et al., 2008) e ainda, com a perda de função renal após transplante renal inter-vivos a curto e a longo prazo (HELLEGERING et al., 2012).

Em 2 estudos descritos por Nolan e Anderson (1998) buscando-se as causas dos casos de IRA registrados em um hospital espanhol e outro francês, 45 a 78% estava relacionado à necrose tubular aguda e 17 a 21% à causas pré-renais, demonstrando o impacto da hipoperfusão sobre a função renal.

As doenças isquêmicas são apontadas como uma das principais causas de insuficiência renal aguda (IRA), juntamente com as lesões tóxicas. A mortalidade na IRA chega a 62% em cães (BEHREND et al., 1996), 47% em gatos (WORWAG, LANGSTON, 2008) e aproximadamente 50% em humanos (LARANJA et al., 1997). Em humanos e felinos, aproximadamente 50% dos sobreviventes apresentam danos renais permanentes (WORWANG, LANGSTON, 2008; BONVENTRE, YANG, 2011).

Segundo Hoste et al. (2006), dos 5383 pacientes admitidos em um hospital, 78% não apresentavam indícios de IRA no momento pré-internamento, mas 45% destes desenvolveram algum grau de comprometimento renal considerando-se o critério de classificação RIFLE (20% para *Risk*, 21% para *Injury* e 4% para *Failure*). Este mesmo autor defende a necessidade de estabelecer medidas terapêuticas nefroprotetoras, com a finalidade de evitar a IRA, especialmente nos pacientes que serão submetidos à

procedimentos sabidamente de risco, como nas técnicas em que se exige a isquemia renal quente.

Segundo Thompson et al. (2012), de 362 pacientes com rim único, submetidos à isquemia quente para nefrectomia parcial, a insuficiência renal aguda (IRA) ocorreu em 19%, sendo que em 17% houve progressão para doença renal crônica. Sugerindo que o tempo total de isquemia quente à que o rim será submetido deve ser inferior a 25 minutos.

Em outro estudo de Thompson et al. (2010), a função renal foi avaliada em pacientes com rim único, submetidos à nefrectomia com isquemia quente e sem isquemia para remoção de neoplasias. Observou-se que os pacientes submetidos à isquemia quente apresentaram maiores chances de evoluir para doença renal crônica em 3,3 anos pós procedimento, quando comparados àqueles que não necessitaram de isquemia.

E ainda, segundo Simmons et al. (2011), quanto maior o tempo de isquemia quente (superior a 40 minutos), maior o risco do paciente apresentar alteração da função renal quando submetidos à nefrectomia parcial, mesmo com rim contralateral funcional.

A alteração de função não foi observada em pacientes submetidos à nefrectomia parcial, com rim contralateral normal, nos estudos de Shekarriz et al. (2004), que avaliaram a função renal em pacientes submetidos à isquemia quente unilateral (em média por 22,5 minutos) para exérese de neoplasias; e Bhayani et al. (2004) que avaliaram a função renal 6 meses pós operatório em pacientes submetidos à isquemia quente para exérese de tumores renais, com tempos de isquemia diferentes.

Contudo, Lane et al. (2011), observaram a ocorrência de IRA em 0,4% dos pacientes submetidos à isquemia quente por tempo de 20 a 30 minutos, em pacientes com função contralateral normal e ainda, observaram que os pacientes submetidos à isquemia quente apresentaram diminuição da função renal a longo prazo, quando comparados àqueles submetidos à nefrectomia sem isquemia ou com isquemia fria.

Com importância ainda maior, destaca-se a isquemia quente realizada no rim de doador vivo. Um estudo realizado por Hellegering et al. (2012), verificou que quanto maior o tempo de isquemia quente (acima de 45 minutos) maior a ocorrência de comprometimento funcional do órgão transplantado.

Desta forma, a IRA não pode ser estudada apenas como enfermidade a ser tratada, mas sobretudo a ser prevenida (NOLAN, ANDERSON, 1998; HOSTE et al., 2006; BONVENTRE, YANG, 2011), especialmente nos rins doados em transplantes intervivos, cujo receptor permanecerá portando aquele rim (único) submetido à isquemia quente durante a sua retirada do doador.

## 2.6 ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO ÔMEGA 3 E A DOENÇA RENAL

Tanto na doença renal aguda quanto na crônica, existem poucos protocolos terapêuticos que demonstram efetividade em reduzir o progresso das lesões e, portanto, restam o uso das terapias substitutivas e sintomáticas, como as terapias dialíticas, uso de vasodilatadores para controle de pressão arterial e dieta restrita em proteínas (FASSETT et al., 2010).

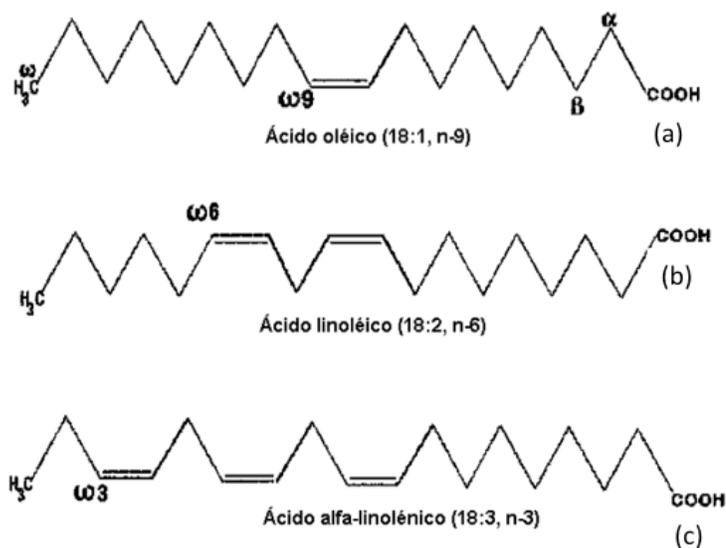
Sabe-se contudo que a via comum das lesões renais envolve inflamação e fibrose; desta forma, terapias que possam influenciar a resposta inflamatória, como o uso de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 vem sendo estudadas (FASSETT et al., 2010).

Para entender melhor sua ação, é preciso entender sua natureza química. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com longas cadeias de hidrocarbonetos e classificados de acordo com a presença de duplas ligações: não saturadas e saturadas – com apenas uma dupla ligação, sendo denominados de monoinsaturados (a) e com duas ou mais duplas ligações, os poliinsaturados (b e c), conforme ilustra a figura 1 (VOET, VOET, PRATT, 2000).

A nomenclatura das famílias dos ácidos graxos está relacionada à posição da primeira dupla ligação a partir do terminal metila da cadeia de hidrocarboneto, as mais

importantes são as famílias ômega 3 (n-3), ômega 6 (n-6) e ômega 9 (n-9) (ROSE, CONNOLLY, 1999). A família n-6 é derivada do ácido linolênico e a família n-3 deriva-se do ácido alfa-linolênico. Em plantas estas duas famílias podem ser convertidas uma na outra por ação enzimática, o que não ocorre em mamíferos e por este motivo, são considerados ácidos graxos poliinsaturados essenciais (SIMOPOULOS, 2002).

Figura 1. Representação esquemática da estrutura química dos ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados.



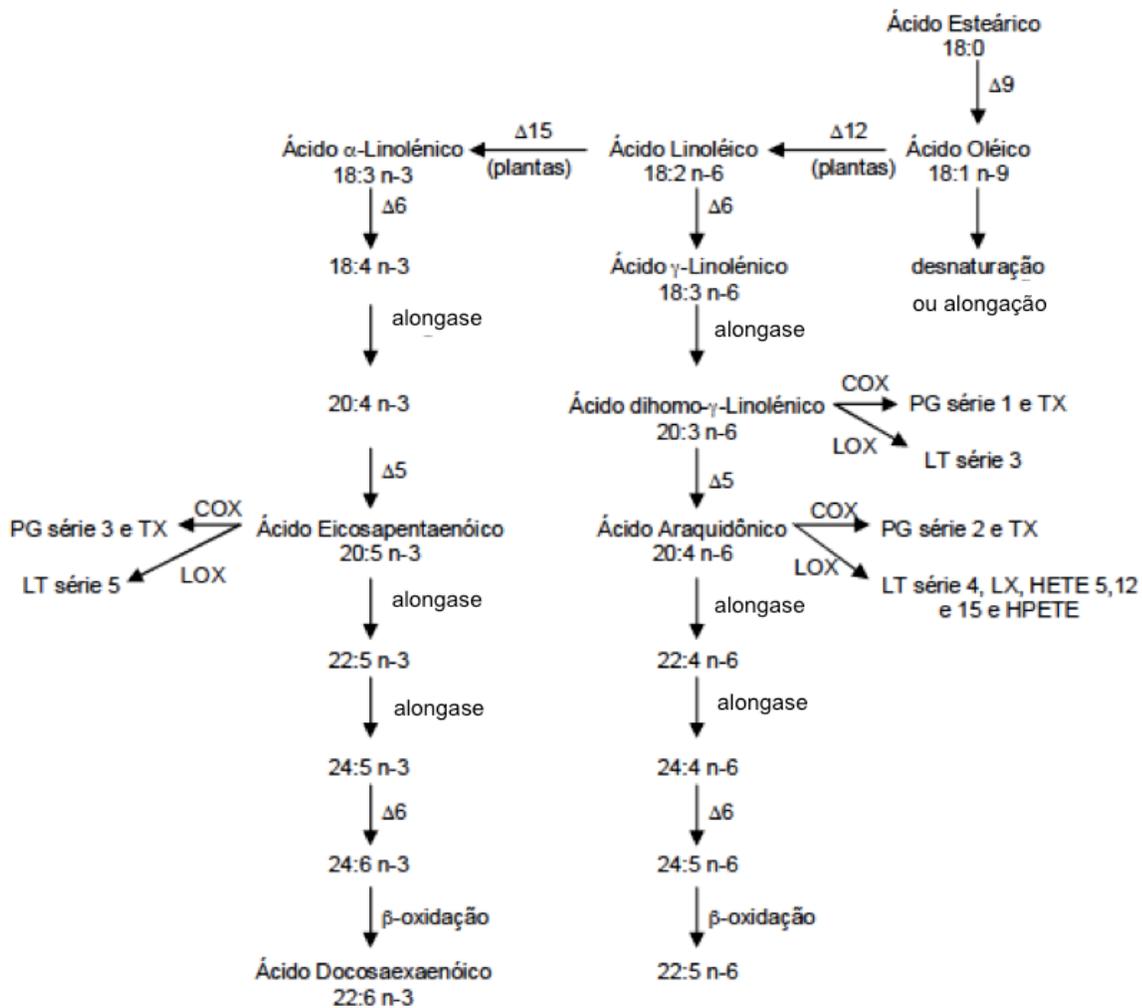
Fonte: AIKAWA, 2004.

Os ácidos graxos essenciais passam por uma série de reações bioquímicas de desaturação (introdução de dupla ligação na cadeia de carbono) e alongação (introdução de mais dois átomos de carbono) após sua ingestão. O ácido linolênico é o principal precursor do ácido araquidônico (AA) e o ácido alfa-linolênico é o precursor do ácido eicosapentaenoico (EPA), ambos ácidos graxos com 20 carbonos que formam os fosfolípidos das membranas biológicas. O ácido alfa-linolênico também é precursor do ácido docosahexaenóico (DHA) (CALDER, 1998; MORAES, COLLA, 2006; WAITZBERG, 2009).

Os ácidos linolênico e alfa-linolênico são substratos das mesmas desaturases, de forma que as famílias n-3 e n-6 competem entre si pelas mesmas enzimas na via metabólica, sendo que os n-3 apresentam maior afinidade pelas enzimas. Desta forma,

uma dieta rica em n-3 é capaz de diminuir a conversão do ácido linolênico em ácido araquidônico, elevando a quantidade de EPA e DHA, conforme ilustra o figura 2 a seguir (HAUGE, CHRISTOFFERSEN, 1984; KELLEY, 2001).

Figura 2. Metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados. Enzimas desaturases  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$  e  $\Delta 15$ ; COX: enzima ciclooxigenase; LOX: enzima lipooxigenase; PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos; TX: tromboxanos; LX: lipoxinas; HETE: ácidos hidroxieicosatetraenóicos; HPETE: ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóicos.



Fonte: Adaptado de CALDER, 1998.

O ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA), derivados das famílias n-6 e n-3 respectivamente, são precursores de eicosanóides, os quais atuam como moduladores químicos em diversos processos biológicos, como na resposta inflamatória, agregação plaquetária, permeabilidade vascular e na formação de interleucinas (MIYASAKA et al., 1996; CALDER, 2001). Os eicosanóides compreendem as prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT), lipoxinas (LX), ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE) e ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETE). Cada família dá origem a uma série diferente de eicosanóides. Do metabolismo do AA, a ciclooxigenase (COX) leva à formação de prostaglandinas e tromboxanas da série 2. Do metabolismo do EPA, a mesma enzima é capaz de induzir a formação dos mesmos eicosanóides, porém da série 3. Existem duas isoformas de COX: a COX-1 (enzima constitutiva) e a COX-2 (enzima induzível). Outra enzima relacionada com a formação de eicosanóides é a 5-lipooxigenase (5-LOX). Quando atua sobre o AA, induz a formação de leucotrienos da série 4 (LTA<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub>), HPETE e HETE da série 5; já atuando sobre EPA, desencadeia a produção de leucotrienos da série 5 (ALEXANDER, 1998; CALDER, 2001).

Todos os eicosanóides derivados da família n-6 apresentam maior efeito inflamatório que os da família n-3, pois possuem maior capacidade de agregação plaquetária, maior atividade vasoconstritora e por serem potentes agentes quimiotáticos (ALEXANDER, 1998; CALDER, 2001). Desta forma, os ácidos graxos poliinsaturados da família n-3, especialmente EPA e DHA, possuem importante papel na modulação inflamatória, pois podem modificar a resposta imunitária, inibindo a produção de citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa e de interleucinas IL-1 e IL-6 por monócitos. A capacidade deste ácido graxo poliinsaturado em antagonizar a produção de eicosanóides derivados do metabolismo do ácido linolênico constitui ponto chave antiinflamatório (WAITZBERG, 2009).

Nos rins, existem três principais vias do metabolismo do ácido araquidônico: via ciclooxigenase (formação de prostaglandinas e tromboxanos), via lipooxigenase (que leva a formação de ácido eicosatetraenóico e leucotrienos) e, a via do citocromo P-450 (formação de ácido epoxieicosatrienóico, ácido eicosatetraenóico e derivados

monooxigenados do ácido araquidônico). O sistema enzimático das ciclooxigenases é a principal via do ácido araquidônico presente no rim e seus produtos modulam a ação fisiológica de outros hormônios com atuação no tônus vascular renal, função glomerular e mesangial e ainda na homeostase de sal e água. E ainda, os produtos da via das ciclooxigenases estão listados como mediadores de alterações funcionais renais em muitas doenças glomerulares, IRA e doença renal crônica, rejeição de transplantes, nefrotoxicidade à ciclosporina, síndrome hepatorenal, nefropatia diabética e hipertensão de origem renal (FERNANDEZ et al., 2004).

O uso dos óleos de peixe ricos em ácido graxo poliinsaturado ômega 3 (AGPI n-3) como terapia têm sido suscitado como benéfico por diversos mecanismos de ação como: (1) aumento da circulação de tromboxanos A<sub>3</sub> seguido de aumento das concentrações de prostaglandinas (PG<sub>12</sub> e PG<sub>13</sub>) - potentes vasodilatadores – que promoveriam melhora da função renal e redução da pressão arterial; (2) aumento da produção endotelial de fatores de relaxamento (EDRF); (3) aumento de TGF-beta, uma citocina imunomodulatória potente que atua reduzindo a ativação de linfócitos T e portanto limitando a resposta inflamatória local; (4) possui ação dose-dependente pequena, na redução da pressão arterial sistêmica, especialmente o DHA; (5) efeito hipotrigliceridemiante e; (6) redução da agregação plaquetária, resultando em aumento do tempo de sangramento, o que melhoraria a fibrinólise (LAURETANI et al., 2009).

Além dos efeitos renais antiinflamatórios, antifibróticos e vasodilatadores, os AGPI n-3 ainda são empregados na terapia de combate ao estresse oxidativo em diversas outras doenças como depressão, mal de Alzheimer, artrite, neoplasias, cardiopatias, entre outras (MORAES, COLLA, 2006).

Benefícios renais foram demonstrados em diversas pesquisas, como na realizada por Hassan e Gronert (2009), que submeteram ratos à isquemia quente por 30 e 45 minutos e administraram duas dietas com diferentes proporções de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e 6, (7:3 e 1:30) por 30 dias pré-operatório. Houve acentuada elevação na concentração de creatinina nos animais que receberam a dieta com maior proporção de ômega 6 (1:30) e aqueles que receberam dieta com maior proporção de ácido graxo poliinsaturado ômega 3 (7:3) mantiveram a função renal normal. O grupo

que sofreu isquemia por 45 minutos e dieta com maior proporção de AGPI n-6 apresentou 100% de mortalidade e aqueles que receberam dieta com maior proporção de AGPI n-6:n-3, 100% de sobrevivência.

An et al. (2009) demonstraram que há redução da atividade pró-inflamatória e pró-fibrótica em rins de ratos submetidos à técnica de exérese cirúrgica de 5/6 do tecido renal. Também Fernandez et al. (2004) observaram proteção da função renal em ratos com caquexia do câncer quando comparados a ratos normais.

Ainda, Matsumoto et al. (2009) em seu estudo utilizando ratos com disfunção da artéria mesentérica comprovaram após 4 semanas de administração de  $300 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$  de ácido eicosapentaenóico (EPA) que as artérias analisadas demonstraram melhor contração pela menor expressão de COX-2, ativação de fator nuclear-kB e inibição da (*signal regulated kinase*) ERK.

Existem estudos que comprovaram a ação moduladora sobre lipídios, demonstrando que a administração de ácido graxo poliinsaturado ômega 3 tem a capacidade de diminuir as concentrações de triglicerídeos em pacientes com hipercolesterolemia. Harris (1997) fez a suplementação de EPA e DHA a sete espécies animais diferentes e observou a diminuição de LDL e VLDL em todas as espécies analisadas. Os valores de HDL se mantiveram inalterados.

Adicionalmente, em se tratando de situações de isquemia-reperfusão ressalta-se o efeito anti-trombogênico. Conforme demonstrado por Woodman et al. (2003), a suplementação de EPA e DHA em pacientes diabéticos tipo 2 levou ao aumento do tempo de sangramento e menor agregação plaquetária. Comparando-se a administração de DHA e EPA, observou-se menor agregação de colágeno nos pacientes que receberam DHA, mostrando sua superioridade em relação ao EPA.

## CAPÍTULO 3

### **3 IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE RICO EM ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO ÔMEGA 3 SOBRE A FUNÇÃO E MORFOLOGIA RENAL DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À ISQUEMIA QUENTE**

*(Impact of oil fish rich in polyunsaturated fatty acids omega 3 supplementation on renal function and morphology in rats wistar submitted to warm ischemia)*

#### **RESUMO**

A isquemia quente renal é uma técnica utilizada nos transplantes renais intervivos e em outras técnicas cirúrgicas dentro da urologia, incluindo nefrectomia parcial. O tempo de isquemia renal prolongado bem como os danos ligados à reperfusão, estão associados à lesões renais morfo-funcionais agudas, potencialmente permanentes, desenvolvimento de insuficiência renal aguda e rejeição do órgão transplantado. O uso de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 vêm sendo amplamente estudado em diversas doenças agudas e crônicas devido às suas propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, antifibróticas, vasodilatadoras e anti-trombogênicas. Objetivou-se neste estudo comparar a função renal e as alterações histopatológicas renais em ratos wistar submetidos à isquemia quente por 30 minutos seguida de nefrectomia contralateral em grupo controle (não suplementado) com grupos suplementados, em diferentes tempos pós cirúrgicos (24 horas e 30 dias). Observou-se que os valores de creatinina plasmática pós operatória apresentaram-se compatíveis com insuficiência renal aguda em todos os grupos, no período de 24 horas; mas apenas os animais suplementados apresentaram elevação dos valores basais com diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Ainda, o grupo suplementado com óleo de peixe rico em ácido graxo poliinsaturado ômega 3 no período pós operatório, apresentou valores de creatinina plasmática superiores aos do grupo controle no pós operatório de 30 dias ( $p < 0,05$ ). À histopatologia avaliaram-se lesões de vacuolização apical celular, necrose tubular, descolamento, dilatação tubular, inflamação e presença de material eosinofílico nas células tubulares renais, conferindo-

se um escore de lesão à cada parâmetro conforme critérios de Goujon et al. Não observou-se diferença estatística ( $p < 0,05$ ) nos escores de lesão histopatológica entre todos os rins submetidos à isquemia quente, tanto nos grupos suplementados quanto os não suplementados e entre os rins normais – não submetidos à isquemia, contudo os maiores escores de lesões foram encontrados nos rins que sofreram a isquemia quente tanto no período 24 horas quanto 30 dias. Conclui-se que o uso de ácido graxo poliinsaturado ômega 3, neste estudo, não conferiu nefroproteção - funcional e morfológica - ao insulto de isquemia quente e reperfusão.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos poliinsaturados ômega 3. Renoproteção. Isquemia quente. Reperfusão. Histopatologia renal.

## **ABSTRACT**

The warm renal ischemia is a technique used in living kidney transplantation and other surgical techniques in urology, including partial nephrectomy. The prolonged renal ischemia time and damage associated with reperfusion are associated with morphological and functional renal injury, potentially permanent, acute onset kidney failure and graft loss. The use of omega-3 polyunsaturated fatty acids have been extensively studied in various acute and chronic diseases due to its anti-inflammatory, antioxidant, antifibrotic, vasodilatory and anti-thrombogenic effects. The aim of this study was to compare the renal function and renal histopathological changes in Wistar rats submitted to warm ischemia for 30 min followed by contralateral nephrectomy in the control group (without supplemented) with supplemented groups with fish oil rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids, at different post surgical times (24 hours and 30 days). It was observed that the values of postoperative serum creatinine were compatible with acute renal failure in all groups at 24 hours, but only supplemented animals showed an increase from baseline values with statistical difference ( $p < 0.05$ ). In addition, plasma creatinine values were higher in the group supplemented with fish oil rich in omega-3 polyunsaturated fatty acid during the postoperative period than the control group at 30 days postoperatively ( $p < 0.05$ ). Renal histopathology observed

apical cytoplasm vacuolization, tubular necrosis, tubular detachment, tubular dilatation, inflammation and eosinophilic material presence in the renal tubular cells, was graded in scores related with the degree of injury to each parameter, following Goujon et al. criteria. No statistical difference was observed ( $p < 0.05$ ) in histological injury scores between all kidneys submitted to warm ischemia in both groups (supplemented and non supplemented) and normal kidneys (not submitted to ischemia), however the higher scores lesions were found in kidneys that were submitted to warm ischemia both during 24 hours for 30 days. We conclude that the use of omega-3 polyunsaturated fatty acid in this study, did not confer renoprotection - functional and morphological – to the insult of warm ischemia and reperfusion.

**Keywords:** Omega-3 polyunsaturated fatty acids. Renoprotection. Warm ischemia. Reperfusion. Renal histopathology.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A preservação da função renal em procedimentos intervencionistas é um ponto de constante aprimoramento dentro da nefrologia e urologia. Algumas técnicas cirúrgicas como nefrectomia parcial e nefrotomia, requerem a interrupção momentânea do fluxo de sangue renal com o objetivo de reduzir a hemorragia transoperatória, procedimento conhecido como isquemia quente (DERAJAVAN, 2006; ADIN, SCANSEN, 2011; HOLT, 2011). Este procedimento também faz parte da captação de rins de doadores vivos, na primeira etapa do transplante renal (HALAZUN et al., 2007).

A isquemia quente leva a importante redução da hemodinâmica renal e pode causar lesões morfofuncionais momentâneas ou permanentes do órgão (DEJAVARAN, 2006). Quando as lesões tissulares são extensas a ponto de comprometerem cerca de 65% da massa funcional renal, estabelece-se a insuficiência renal aguda ou injúria renal aguda (IRA), que se caracteriza como declínio abrupto da função renal, mensurada pela elevação sérica da creatinina, que ocorre de horas a semanas após a injúria, contudo em período inferior a 3 meses, com alta morbidade e mortalidade (VAIDYA et al., 2008; BONVENTRE, YANG, 2011; COWGILL, LANGSTON, 2011).

A ocorrência de insuficiência renal aguda (IRA) pós-cirúrgica em nefrectomia parcial foi relacionada com tempos de isquemia prolongados, sendo proporcional à presença de menor volume funcional de néfrons na massa renal remanescente (SIMMONS et al., 2011; THOMPSON et al., 2012). Hellegering et al. (2012) investigaram retrospectivamente a função precoce de rins transplantados e seus resultados corroboram com outros autores (SIEDLECKI et al., 2011) revelando que o prolongado tempo de isquemia quente está diretamente relacionado à diminuição da sobrevida do enxerto transplantado. Atribui-se a este procedimento causa pré-renal e renal intrínseca de lesão aguda e potencialmente permanente (NOLAN, ANDERSON, 1998).

O reestabelecimento da perfusão tecidual é fundamental para minimizar tais danos, tornando-se a medida terapêutica mais urgente. Contudo, mesmo sabendo-se que há a necessidade da reperusão, a circulação de radicais livres de oxigênio

formados durante o período isquêmico inicia uma complexa cascata de eventos levando a lesões tissulares adicionais e ao acúmulo intracelular adicional de cálcio (BAKER et al., 1985; BULKLEY, 1987; EVORA et al., 1996) culminando em apoptose e necrose celular (PADANILAM, 2003).

Sabe-se contudo que a via comum das lesões renais envolve inflamação e fibrose; desta forma, terapias que possam influenciar a resposta inflamatória, como o uso de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (AGPI n-3), vem sendo estudadas (FASSETT et al., 2010).

A família ômega 3, representada especialmente pelo EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico), é composta por ácidos graxos essenciais, poliinsaturados e tem especial importância na composição fosfolipídica da membrana plasmática (WAITZBERG, 2009). Desempenham funções nutricional, estrutural e reguladora dos lipídios, atuando de forma significativa na hemodinâmica e oxigenação, assim como na resposta inflamatória e controle de triglicerídeos. Ainda, a proteção celular é atribuída à ação inibitória sobre a produção de eicosanóides derivados do ácido araquidônico, como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e citocinas pró-inflamatórias nos tecidos periféricos (WAITZBERG, 2009). Ressalta-se também seu efeito anti-trombogênico (WOODMAN et al., 2003), culminando em menor agregação plaquetária.

O objetivo deste estudo foi avaliar a função e morfologia de rins de ratos submetidos à isquemia quente unilateral, sob efeito de três diferentes protocolos de suplementação oral de óleo de peixe rico em ácidos graxos poliinsaturados ômega 3, em dois momentos pós operatórios.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Os animais

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob número de registro 741. Foram utilizados 42 ratos da raça Wistar (*Rattus Norvegicus*), machos e adultos, pesando entre 250 e 400g, acondicionados em gaiolas com água e comida *ad libitum*, com temperatura (23°C), umidade e ciclo dia-e-noite (12 horas) controlados.

Os animais foram divididos, de forma aleatória, em 4 grupos, conforme tratamentos descritos no quadro 2.

Quadro 2: Delineamento do estudo, dividindo-se os animais por grupo, separados conforme o programa de suplementação a ser estabelecido e os períodos de eutanásia pós-operatória.

Grupo	Suplementação com óleo de peixe na dose de 1g.Kg <sup>-1</sup>	N	Eutanásia após procedimento cirúrgico (n)	
			24 horas	30 dias
GC	Nenhuma	12	6	6
G1	30 dias PRÉ operatorio	12	6	6
G2	30 dias PÓS operatorio	6	-	6
G3	30 dias PRÉ e PÓS operatórios	12	6	6

Os 6 animais utilizados no grupo controle, eutanasiados 24 horas após a cirurgia foram considerados também como os 6 animais eutanasiados em 24 horas no grupo G2, pois não receberam suplementação com óleo de peixe até o momento da eutanásia.

Dentro de cada grupo, os animais foram identificados na cauda com a numeração de 1 a 12, correspondendo os animais de número 1 a 6 àqueles eutanasiados em 30 dias de pós-operatório em todos os grupos, e os animais de 7 a 12 àqueles eutanasiados em 24 horas pós operatório nos grupos controle, G1 e G3.

### **3.2.2 O óleo de peixe**

Foi utilizado óleo de peixe comercial<sup>1</sup> em cápsulas para suplementação dos animais. Cada cápsula continha um grama de ácidos graxos poliinsaturados marinhos, sendo 0,2 g de ômega 3 EPA (ácido eicosapentaenóico) e 0,1 g de ômega 3 DHA (ácido docosahexaenóico) – Proporção EPA:DHA de 2:1. O óleo de peixe foi administrado por via oral na dose de 1g.Kg<sup>-1</sup> de peso corporal. Imediatamente antes da administração, o óleo era retirado da cápsula por meio de seringa agulhada estéril e administrada diretamente por via oral nos animais, com boa aceitação. A medicação utilizada foi armazenada ao abrigo da luz, a temperatura ambiente.

### **3.2.3 O procedimento cirúrgico**

Todos os animais foram submetidos ao procedimento de isquemia e reperfusão cirúrgica, após anestesia com a associação de cloridrato de quetamina<sup>2</sup>, na dose de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> e xilazina<sup>3</sup>, na dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup>, por via intramuscular. Foi então realizada a tricotomia abdominal e a identificação com marcação na cauda. Uma vez fixados os

---

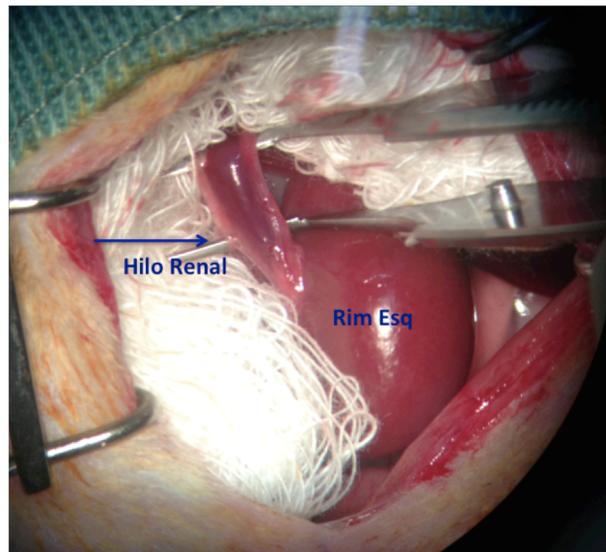
<sup>1</sup> Óleo de Peixe Herbarium®

<sup>2</sup> Ketamina 50® 50 mg.mL<sup>-1</sup>, solução injetável esterilizada Holliday

<sup>3</sup> Anasedan® 20 mg.mL<sup>-1</sup>, solução injetável esterilizada Vetbrands

animais à mesa operatória aquecida (36-37°C), em decúbito dorsal, foi realizada a antisepsia da região operatória com iodopovidine e colocação de campos cirúrgicos para a incisão mediana xifopubiana, afastamento das vísceras para localização do rim esquerdo, para dissecação do hilo renal (figura 3) e clampeamento com *clamp* vascular tipo *bulldog* (figura 4) durante 30 minutos. Durante o período de isquemia, os animais foram mantidos sob aquecimento e com abdome coberto por gaze embebida em solução fisiológica estéril para minimizar as perdas volêmicas por exsudação. Terminado o tempo estabelecido, removeu-se o *clamp* vascular e procedeu-se a nefrectomia contralateral à direita. Após revisão da cavidade peritoneal, foi realizado o fechamento da parede abdominal em dois planos, com sutura contínua nos planos musculares e sutura de pele em pontos simples, ambas com fio absorvível sintético de ácido poliglicólico 4.0<sup>4</sup>.

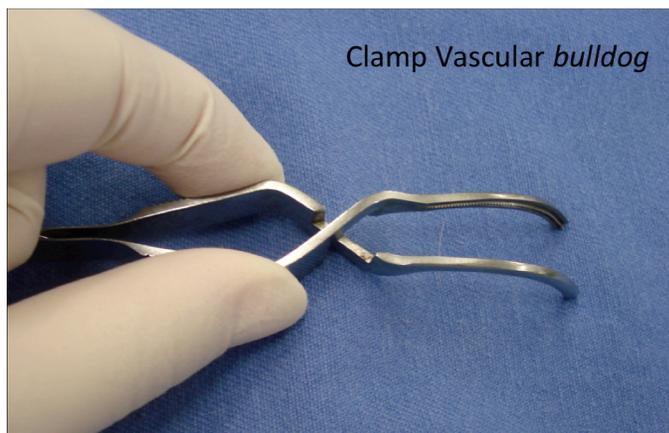
Figura 3. Dissecação do hilo renal esquerdo para posterior clampeamento.



---

<sup>4</sup> Safil® Green B/Braum

Figura 4. Clamp vascular tipo *bulldog* utilizado para oclusão do hilo renal por 30 minutos.



No pós operatório imediato, todos os animais foram medicados com antiinflamatório não esteroideal, carprofeno<sup>5</sup>, na dose de 5 mg.Kg<sup>-1</sup> por via subcutânea em dose única, e mantidos com solução de dipirona sódica<sup>6</sup> na dose de 8 mg.Kg<sup>-1</sup> por via subcutânea para analgesia, a cada 12 horas nos 2 dias consecutivos. Todos os animais receberam 3,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%<sup>7</sup> por via subcutânea no pós operatório imediato.

A realização da técnica cirúrgica transcorreu sem intercorrências. O índice de mortalidade deste estudo foi de 16% (8 ratos em 50 animais submetidos ao procedimento cirúrgico). Todos os animais que vieram a óbito foram substituídos. Dos 8 animais que vieram à óbito, 1 apresentou evisceração, e os demais vieram à óbito no pós operatório imediato por depressão cardio-respiratória.

### 3.2.4 Coletas de materiais biológicos

Foram coletadas amostras de sangue por meio de punção da veia caudal com uso de seringa heparinizada<sup>8</sup> para avaliação da creatinina no pré-operatório imediato, considerando para todos os animais, a amostra de sangue colhida no momento pré

<sup>5</sup> Rimadyl<sup>®</sup> 50 mg.mL<sup>-1</sup>, solução injetável esterilizada Pfizer

<sup>6</sup> D-500<sup>®</sup> 500 mg.mL<sup>-1</sup>, solução injetável esterilizada Fort Dodge

<sup>7</sup> Cloreto de sódio 0,9%<sup>®</sup> frasco com 10 mL Samtec

<sup>8</sup> Heparina sódica<sup>®</sup> 5000 UI mL<sup>-1</sup>, solução injetável esterilizada Ariston

operatório imediato como controle próprio. No momento da eutanásia – em 24 horas para n=6 dos grupos controle, G1 e G3, e em 30 dias para os demais 6 animais de cada grupo, incluindo o G2, as amostras de sangue foram coletas por meio de punção intra-cardíaca, após anestesia. As amostras de sangue heparinizado foram centrifugadas<sup>9</sup> a 3500 rotações por tempo de 5 minutos logo após a coleta. Em seguida o plasma foi aliqotado em frascos do tipo *ependorf* e armazenado em freezer -20°C até o momento da análise laboratorial, que não excedeu o tempo de 3 meses.

O rim direito, foi removido após o procedimento de isquemia do rim esquerdo e imediatamente embebido em solução de formaldeído 4% para posterior análise histopatológica nos animais do grupo controle. O mesmo procedimento foi adotado para o rim esquerdo, após a eutanásia, contudo em todos os animais de todos os grupos.

### 3.2.5 Eutanásia dos animais

A eutanásia foi realizada em todos os animais em diferentes momentos, conforme descrito no quadro 2, fazendo-se uso da associação de cloridrato de quetamina<sup>10</sup> (50 mg.Kg<sup>-1</sup>) e xilazina<sup>11</sup> (10 mg.Kg<sup>-1</sup>) intramuscular para anestesia e posteriormente a administração de tiopental sódico<sup>12</sup> por via intra-peritoneal, na dose de 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, seguido por isoflurano inalatório<sup>13</sup>, até o momento de registro de parada cardiorrespiratória.

---

<sup>9</sup> Centrifuga Sorvall® MC12V DuPont

<sup>10</sup> Ketamina 50® 50 mg.mL<sup>-1</sup>, solução injetável esterilizada Holliday

<sup>11</sup> Anasedan® 20 mg.mL<sup>-1</sup>, solução injetável esterilizada Vetbrands

<sup>12</sup> Thiopentax® 1g, solução injetável esterilizada Cristália

<sup>13</sup> Isoflurano® 1mL 1mL<sup>-1</sup>, solução inalatória BioChimico

### 3.2.6 Determinação da IRA

A determinação da concentração plasmática de creatinina foi realizada por meio da utilização de kit comercial<sup>14</sup> pela técnica de picrato em meio alcalino, por espectrofotometria. Todas as análises foram realizadas no mesmo momento para evitar variações inter-ensaios.

Foi definido como IRA, o aumento pós-operatório de creatinina plasmática superior a 0,3 mg.dL<sup>-1</sup> quando comparado com momento pré-operatório imediato, conforme classificação RIFLE, demonstrada no quadro 1 a seguir.

Quadro 1: Sistema de classificação RIFLE para pacientes com IRA

Estágio	Creatinina Sérica
<b>1 – Risco “Risk”</b>	Aumento de $\geq 0,3$ mg.dL <sup>-1</sup> ou $\geq 150$ a 200% do valor basal
<b>2 – Injúria “Injury”</b>	Aumento de 200-300% do valor basal
<b>3 – Falência “Failure”</b>	Aumento > 300% do valor basal
<b>Perda “Loss”</b>	IRA persistente, completa perda de função por 4 semanas
<b>Estágio Final “End-Stage”</b>	Perda da função renal por 3 meses

Fonte: Adaptado de Vaidya et al, 2008

### 3.2.7 Análise histopatológica

As peças renais conservadas em solução de formaldeído a 4% passaram por processo de inclusão em parafina quente para realização de cortes de 4-5  $\mu$ m por microtomia. Os fragmentos foram identificados e colocados em lâminas de vidro para receber as colorações histoquímicas de hematoxilina-eosina (HE).

Todas as lâminas foram lidas por microscopia óptica, por patologista que desconhecia os protocolos de suplementação utilizados.

A análise histopatológica foi realizada adaptando-se aos critérios de Goujon et al. (1999), aplicados para avaliação das alterações sugestivas de necrose tubular

<sup>14</sup> Creatinina Biolíquid Laborclin®

aguda, utilizando-se 5 critérios passíveis de observação à microscopia óptica: vacuolização citoplasmática apical, descolamento celular, necrose tubular, presença de material eosinofílico na luz do túbulo e infiltrado inflamatório, graduadas em escores conforme a abrangência das lesões: 1 - nenhuma anormalidade, 2 - lesões afetando 10% ou menos do rim, 3 - lesões afetando 25% do rim, 4 - lesões afetando 50% do rim e 5 - 75% ou mais de lesão renal.

Foram avaliados todos os rins esquerdos (que sofreram a isquemia por 30 minutos) no momento 24 horas nos grupos controle, G1 e G3, no momento 30 dias foram avaliados os grupos controle, G1, G2 e G3. E ainda, foram avaliados seis rins direitos (não isquemiados) de animais sem suplementação, usados como parâmetro de normalidade (doravante denominado – grupo N).

### **3.2.8 Análise estatística**

As análises foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad Prism version 3.00 for Windows, San Diego - Califórnia, EUA. Os resultados obtidos foram expressos por médias e medianas, valores mínimos, valores máximos, diferença aritmética e desvios padrões ou por frequências, quando apropriado. Para todas as análises foi adotado nível de significância de 5% ( $p=0,05$ ).

Para determinação de IRA, comparou-se os valores de creatinina plasmática pré e pós operatório dentro de cada grupo individualmente, em dois momentos diferentes (pós operatório de 24 horas e de 30 dias), utilizando-se test t student pareado.

Buscando-se avaliar se houve alteração estatística nos valores de creatinina plasmática, ligada ao tratamento estabelecido em cada um dos tempos, portanto diferença entre os grupos, utilizou-se análise de variância (One-Way ANOVA) não pareado seguido pelo teste de médias de Bonferroni.

Para análise das alterações histopatológica, comparou-se estatisticamente o número de animais que apresentou cada um dos escores (1 a 5) para cada critério, nos diferentes momentos – 24 horas e 30 dias, incluindo nas análises o grupo N (rins direitos normais). Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de médias de Dunn's.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo experimental de isquemia renal quente em ratos é muito utilizado por diversos autores (PARK et al., 2008; MEYER et al., 2011; BAGETTI-FILHO et al., 2012), principalmente para avaliação de parâmetros relacionados à viabilidade morfofuncional do órgão após o procedimento.

O principal efeito benéfico desta oclusão é a redução da perda sanguínea, facilitando a realização do procedimento pelo cirurgião, contudo esta interrupção do fluxo sanguíneo pode levar ao declínio na taxa de filtração glomerular, considerando-se que a arquitetura celular altamente diferenciada dos rins é dependente de metabolismo aeróbio primário intenso (TIRAPELLI et al., 2009; WSZOLEK et al., 2011; D’ALESSANDRO et al., 2012). A gravidade da lesão renal pode ser reversível e é diretamente proporcional ao tempo estabelecido para isquemia (RAMAN et al., 2011; D’ALESSANDRO et al., 2012). Por este motivo preconiza-se que o tempo de isquemia seja o menor possível, sendo 30 minutos considerados o “gold standard” em procedimentos abertos e laparoscópicos (SIMMONS et al., 2011, POULIOT et al., 2011). Simmons et al. (2013) avaliaram o índice de atrofia renal em pacientes submetidos à isquemia e as menores lesões puderam ser observadas quando o tempo de clampeamento foi inferior a 40 minutos. Recentes investigações demonstram ainda que o efeito deletério relaciona-se a cada minuto adicional de isquemia comprovando que, mesmo respeitando-se os limites aceitáveis, ocorrerá lesão renal (LANE et al., 2011). Para o atual estudo, com objetivo de aproximação à realidade cirúrgica, preconizou-se manter 30 minutos de isquemia quente, tendo este tempo como limite máximo para realização do procedimento. Neste modelo de isquemia renal, é importante justificar a importância da nefrectomia contralateral, uma vez que a presença de um rim não isquêmico pode interferir na avaliação da resposta ao efeito da isquemia. Além disso, os rins contralaterais serviram neste estudo como controle de normalidade, de acordo com trabalho desenvolvido por Sabbagh et al. (2011).

Quando trata-se de estudos experimentais, o índice de sobrevivência dos animais também está diretamente relacionados ao tempo estabelecido para isquemia (RAMAN et al., 2011), que varia na literatura entre 25 a 120 minutos, de acordo com o

objetivo do pesquisador (RAMAN et al., 2011, BAGETTI-FILHO et al., 2012). Dentro do intervalo de 30 a 45 minutos de isquemia quente, a taxa de sobrevivência dos ratos encontra-se entre 85 a 90% (RAMAN et al., 2011), semelhante ao encontrado no presente estudo (84%), após fixado o tempo de 30 minutos de oclusão vascular.

Com relação à oclusão vascular, Bagetti-filho et al. (2012) demonstraram que o clampeamento arterial resultou em maior densidade do volume glomerular quando comparado ao clampeamento arterial e venoso, sendo considerado ideal para realização da isquemia por reduzir danos causados pelos radicais livres. Porém, no presente estudo foi realizada oclusão arterial e venosa uma vez que deve ser considerada a necessidade de magnificação óptica para dissecação e isolamento da artéria, aumentando o tempo cirúrgico, sem poder excluir a possibilidade de lesões iatrogênicas em virtude da delicada estrutura dos vasos em ratos. Destaca-se, de forma mais relevante, que a oclusão arterial pode ser aplicada apenas em nefrectomia parcial, não sendo utilizada em nefrectomias de doadores. Ainda, em nefrectomias parciais devido neoplasias, a manipulação do tumor poderia aumentar a disseminação de células já que a via hematológica é provavelmente a maior via de desenvolvimento de metástases de carcinomas renais (GLAVES et al., 2008).

A verdadeira extensão da lesão pode ser vista de 24 a 72 horas após a reperfusão (JABONSKI et al., 1983). Desta forma, avaliando os animais dos diferentes grupos em 24 horas objetivou-se relatar as alterações agudas decorrentes deste processo e, aos 30 dias, alterações que poderiam refletir a cronicidade e a perpetuação das lesões.

### **3.3.1 Creatinina plasmática**

Os valores das concentrações plasmáticas de creatinina bem como os valores da diferença aritmética entre as concentrações plasmáticas de creatinina pré e pós-operatórias em cada grupo, nos momentos 24 horas e 30 dias estão listada no APÊNDICE A.

Observou-se que, no período de 24 horas pós operatório, dos 18 animais avaliados (controle, G1 e G3), 13 apresentaram aumento superior a  $0,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ , o

equivalente a 72,2%, compatível com insuficiência renal aguda (IRA) segundo o critério de classificação RIFLE.

A creatinina sanguínea é um marcador da taxa de filtração glomerular em muitas espécies animais, amplamente utilizado na rotina clínica. Contudo, sabe-se que os valores de creatinina somente apresentam alteração quando a taxa de filtração glomerular for alterada em 60 a 75% dos néfrons, ou seja, em aproximadamente  $\frac{3}{4}$  da massa renal total (somando-se ambos os rins) (BRAUN et al., 2003). Neste experimento, uma vez procedida a nefrectomia contralateral, 50% da massa renal foi removida, mas isto não seria suficiente para provocar o aumento da creatinina plasmática. Portanto conclui-se que 72% destes animais sofreram lesão no rim isquemiado, em aproximadamente 30 a 50% da massa renal remanescente, provocando a alteração dos valores plasmáticos de creatinina em 24 horas.

Porém, observou-se que a taxa de filtração não se mostrou alterada na mesma proporção nos animais avaliados aos 30 dias pós-operatórios. Dos 24 animais avaliados neste momento, apenas 2 apresentaram aumento de creatinina plasmática superior a  $0,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ , equivalente a 8,3%. Pode-se concluir que, em 30 dias, apenas 8% dos animais apresentaram lesão do rim isquemiado em aproximadamente 30 a 50% da massa renal remanescente.

Estes números refletem o impacto da lesão de isquemia e reperfusão em todos os animais, nos momentos 24 horas e 30 dias, independentemente da tratamento recebido.

Para compreender melhor este impacto sobre a função renal e buscar os possíveis efeitos nefroprotetores do uso de ácido graxo poliinsaturado ômega 3, torna-se essencial buscar diferenças estatísticas nos valores plasmáticos de creatinina entre os grupos de tratamento, em cada momento avaliado.

No momento 24 horas, os valores de creatinina foram estatisticamente diferentes apenas entre o período pré e pós-operatório nos Grupos Controle (pré- $0,6683 \pm 0,05419 \text{ mg.dL}^{-1}$  e pós- $1,410 \pm 0,4882 \text{ mg.dL}^{-1}$ , sendo  $P=0,0163$ ) e G3, nos quais os animais foram suplementados previamente e posteriormente à cirurgia com AGPI n-3 (pré- $0,6600 \pm 0,03406 \text{ mg.dL}^{-1}$  e pós- $1,012 \pm 0,1931 \text{ mg.dL}^{-1}$ , sendo  $P=0,0079$ ), conforme figura 5.

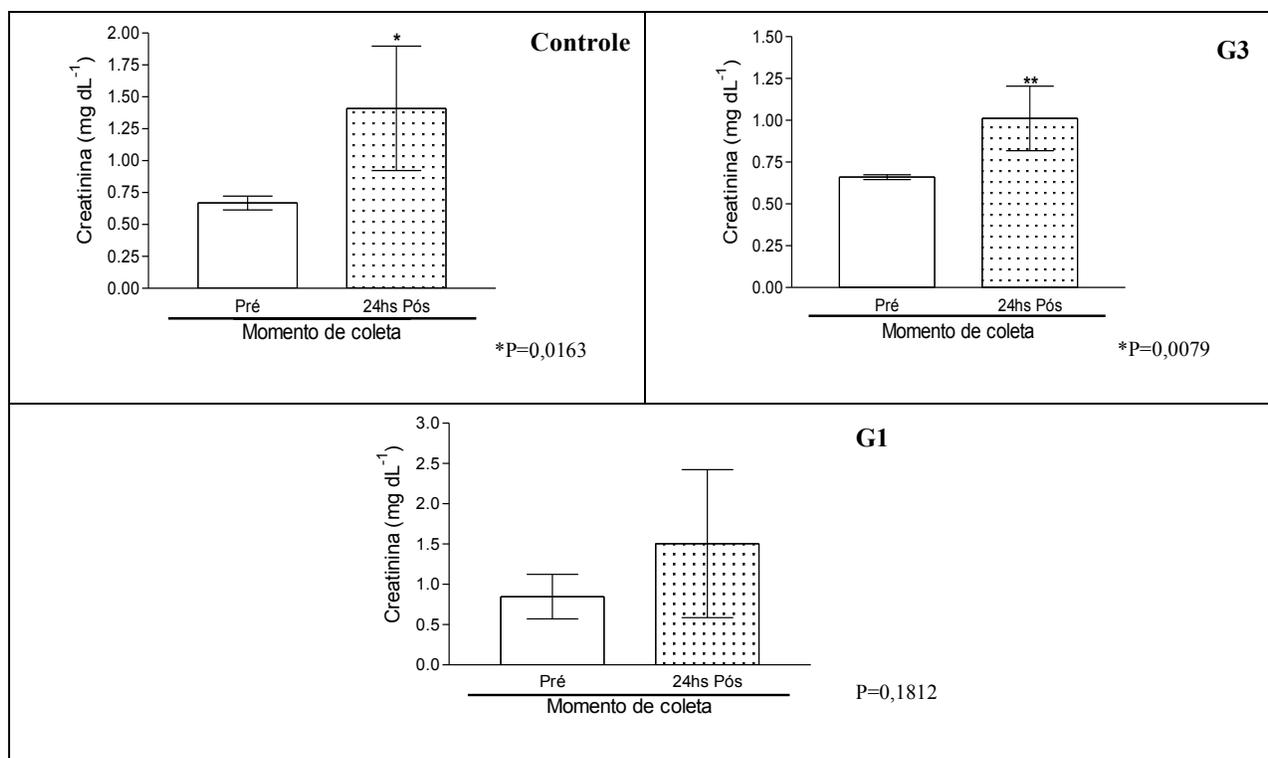


Figura 5. Concentrações plasmáticas de creatinina ( $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) no momento pré-operatório imediato e 24 horas após 30 minutos de isquemia quente em ratos Wistar pertencentes ao Grupo Controle, G1 e G3. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Nestes grupos, é possível afirmar que houve queda da taxa de filtração no pós-operatório imediato, sendo os valores encontrados compatíveis com insuficiência renal aguda (IRA). De fato, no grupo controle, cinco dos animais apresentaram aumento superior a  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  nos valores plasmáticos de creatinina e, no G3, quatro animais mostraram aumento superior a  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ . De acordo com o sistema RIFLE de classificação de IRA, estes valores são compatíveis com redução abrupta da taxa de filtração, corroborando para o diagnóstico de IRA.

Observou-se a grande variância entre as médias pré ( $0,8467 \pm 0,2761 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) e pós operatória ( $1,505 \pm 0,9200 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) e os desvios padrão no Grupo 1 (suplementados previamente com AGPI n-3), no momento 24 horas. Porém, não há diferença estatística ( $P=0,1812$ ) entre os valores, conforme figura 5. É possível que a variância observada neste grupo possa ter influenciado o resultado da análise estatística. Destaca-se a importância desta ressalva, pois observamos neste grupo o

mesmo comportamento dos demais grupos com relação à comparação dos valores de creatinina aos valores de referência e quanto à análise das diferenças aritméticas entre os valores pré e pós, como descrito no início desta seção. Estatisticamente, no Grupo 1 não houve queda da taxa de filtração no pós operatório imediato, mas considerando-se o sistema de classificação RIFLE para determinação risco de IRA, quatro destes animais (66,6%) apresentaram aumento de creatinina superior a  $0,3 \text{ mg.dL}^{-1}$  no momento pós operatório imediato quando comparados ao momento pré operatório, sendo os valores compatíveis com insuficiência renal aguda.

Comparando-se os valores pré e pós operatório no grupo controle no momento 30 dias, observa-se que não há diferença estatística ( $P=0,9691$ ) entre os valores de creatinina plasmática no pré operatório imediato ( $0,7600 \pm 0,1262 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) e no pós operatório ( $0,7633 \pm 0,1240 \text{ mg.dL}^{-1}$ ), conforme figura 6. Entende-se, uma vez que os valores mantiveram-se estatisticamente iguais no momento pré e pós-operatório, que não houve queda da taxa de filtração no pós operatório de 30 dias, ou mesmo indicando recuperação/adaptação da taxa de filtração glomerular para os ratos wistar pertencentes ao grupo controle neste momento, sem suplementação de AGPI ômega 3.

No momento 30 dias, os resultados dos valores de creatinina plasmática foram estatisticamente diferentes comparando-se pré e pós-operatório do Grupo 1 (pré- $0,7467 \pm 0,1046 \text{ mg.dL}^{-1}$  e pós- $0,9017 \pm 0,05193 \text{ mg.dL}^{-1}$ , com  $P=0,046$ ), Grupo 2 (suplementados posteriormente com AGPI n-3, sendo pré- $0,6883 \pm 0,04167 \text{ mg.dL}^{-1}$  e pós- $0,9533 \pm 0,1428 \text{ mg.dL}^{-1}$ , com  $P=0,0049$ ) e Grupo 3 (pré- $0,6750 \pm 0,08264 \text{ mg.dL}^{-1}$  e pós- $0,8500 \pm 0,03633 \text{ mg.dL}^{-1}$ , com  $P=0,0060$ ), conforme figura 6, comprovando a queda na taxa de filtração glomerular. Os animais destes grupos sofreram e mantiveram esta redução na taxa de filtração por 30 dias.

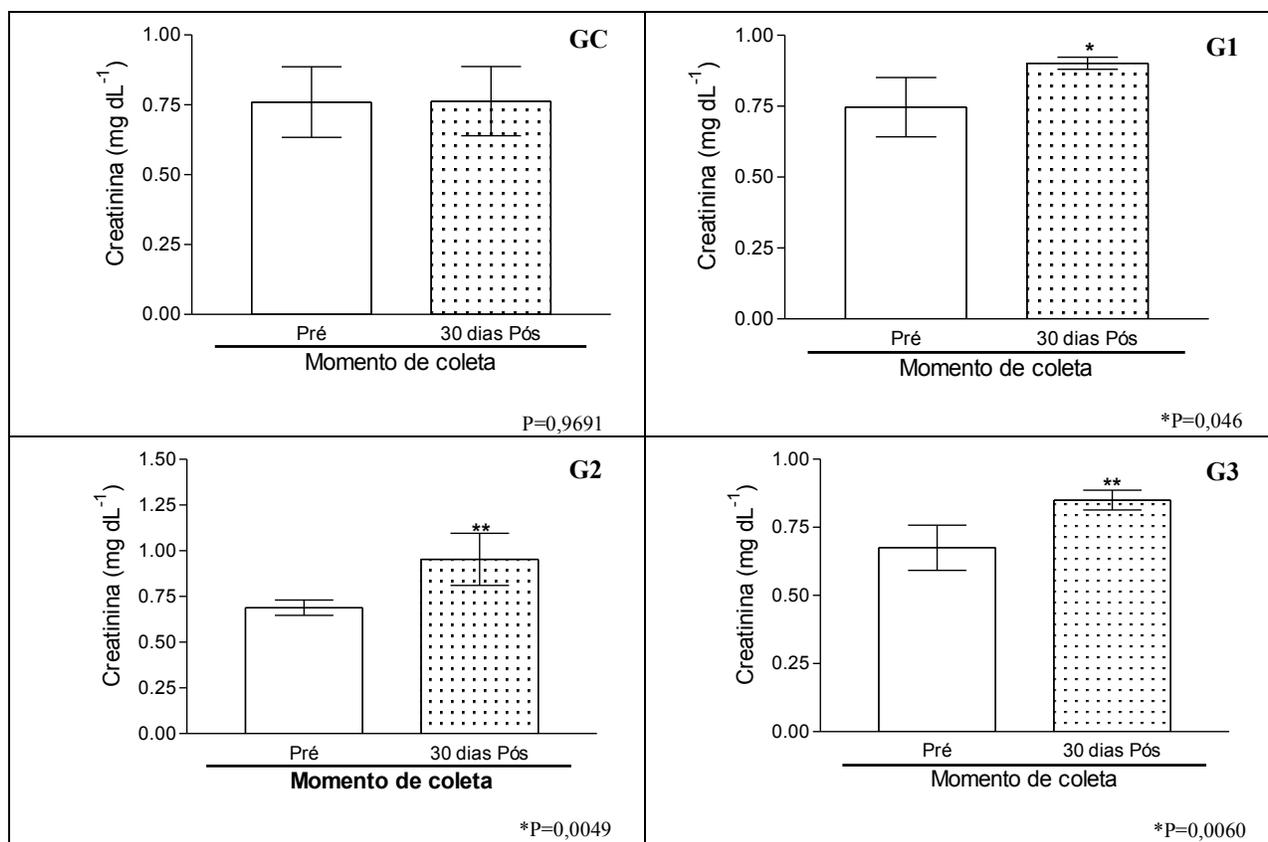


Figura 6. Concentrações plasmáticas de creatinina ( $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) no momento pré-operatório imediato e 30 dias após 30 minutos de isquemia quente em ratos Wistar, pertencentes aos grupos Controle, G1, G2 e G3. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

De forma sintética observou-se que houve diferença estatística entre os valores de creatinina plasmática pré e pós operatório no período de 24 horas nos grupos controle e G3 e observou-se diferença estatística no período de 30 dias nos grupos suplementados (G1, G2 e G3), conforme quadro 3 a seguir.

De forma geral, é possível observar que todos os grupos suplementados com AGPI n-3 apresentaram redução na taxa de filtração pós operatória de 30 dias, quando comparados com os valores pré operatórios imediatos, o que não ocorreu com o grupo controle. O uso do AGPI n-3, na proporção EPA:DHA de 2:1 pode ter influenciado negativamente a taxa de filtração nos animais tratados e observados por 30 dias.

Quadro 3: Tabulação das médias e dos resultados das análises estatísticas considerando-se as concentrações plasmáticas de creatinina pré e pós operatórias em cada grupo analisado. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Grupos		GC		G1		G2		G3	
Momentos		24 hs	30 dias	24 hs	30 dias	24 hs	30 dias	24 hs	30 dias
Média	Pré	0,6683 ± 0,05419	0,7600 ± 0,1262	0,8467 ± 0,2761	0,7467 ± 0,1046	0,6883 ± 0,04167	0,6600 ± 0,03406	0,6750 ± 0,08264	
	Pós	1,410 ± 0,4882	0,7633 ± 0,1240	1,505 ± 0,9200	0,9017 ± 0,05193	0,9533 ± 0,1428	1,012 ± 0,1931	0,8500 ± 0,03633	
Valor de p		0,0163*	0,9691	0,1812	0,0046**	---	0,0049**	0,0079**	0,0080**

Comparando-se os valores de creatinina plasmática pré operatória dos animais eutanasiados 24 horas após o procedimento, pertencentes aos grupos Controle x G1 x G3, observa-se que não há diferença estatística ( $P=0,1276$ ) entre eles, assim como na análise dos valores pré operatórios dos animais eutanasiados com 30 dias - GC x G1 x G2 x G3 ( $P=0,3828$ ). Uma vez que todos os animais solicitados para o estudo foram animais saudáveis, antes da lesão renal provocada pelo procedimento cirúrgico, os valores de creatinina pré-operatório imediato não poderiam ser diferentes entre si, independente do protocolo de suplementação estabelecido.

No momento 24 horas, comparando-se os valores de creatinina plasmática entre os grupos Controle x G1 x G3, observa-se que não há diferença estatística ( $P=0,3634$ ) entre eles. Independente do protocolo de suplementação realizado, todos os animais apresentaram redução da taxa de filtração glomerular, mensurada pela creatinina plasmática, no pós operatório imediato de 24 horas. Neste momento não houve nefroproteção pelo uso de óleo de peixe rico em ácido graxo poliinsaturado ômega 3.

Comparando-se os valores de creatinina plasmática pós-operatória no momento 30 dias entre os grupos, observa-se que há diferença estatística ( $P=0,0283$ ) entre GC x G2, conforme figura 9. Os valores de creatinina pós-operatórios do G2 ( $0,9533 \pm 0,1428$  mg.dL<sup>-1</sup>) revelaram-se superiores aos valores de creatinina pós operatória do GC ( $0,7633 \pm 0,1240$  mg.dL<sup>-1</sup>). Tal fato indica que o grupo suplementado

posteriormente ao procedimento cirúrgico de isquemia renal por 30 minutos seguida de nefrectomia contralateral mostrou piora da taxa de filtração glomerular quando comparado ao grupo controle, indicando que o uso de AGPI n-3 no momento pós cirúrgico possivelmente possa influenciar de forma negativa a taxa de filtração glomerular.

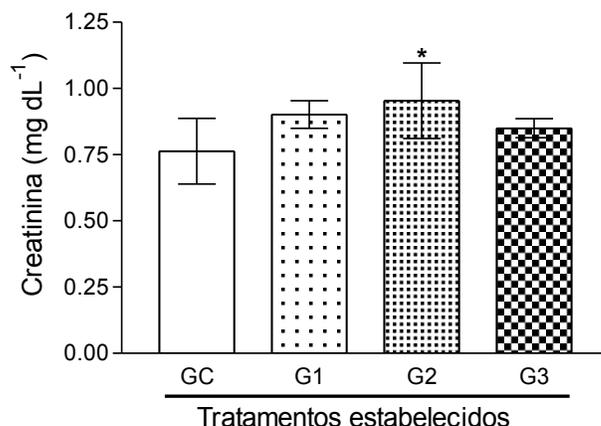


Figura 9 - Concentrações plasmáticas de creatinina ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) no momento 30 dias após técnica de isquemia quente renal por 30 minutos, entre os grupos GC, G1, G2 e G3. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* $P=0,0283$  entre GC e G2

A mensuração de creatinina sanguínea é considerada como um marcador indireto e tardio para avaliação de lesão renal, pois apenas altera-se quando mais de 60% da massa renal funcional está lesionada (BRAUN et al., 2003). Porém, torna-se necessário ressaltar que houve diferença estatística em vários grupos e momentos, mesmo utilizando-se esta ferramenta considerada pouco sensível, indicando comprometimento na taxa de filtração glomerular e lesão no rim remanescente.

A utilização do ácido graxo poliinsaturado ômega 3 (AGPI n-3), especialmente EPA e DHA, vêm sendo estudada há 25 anos no tratamento de diversas doenças renais, agudas e crônicas, com mecanismos patogênicos diferentes (nefropatia por IgA, nefrite por lúpus, doença renal policística, glomerulopatia membranosa, nefrectomia 5/6, nefropatia tóxica induzida por gentamicina e ciclosporina, nefropatia diabética e injúria renal isquêmica) e os resultados são ainda controversos. As dúvidas entre os pesquisadores acerca da disparidade das respostas estão relacionadas à dose utilizada, à proporção de DHA e EPA utilizada, o tempo de duração da terapia e o tamanho das amostras populacionais estudadas (FASSETT et al., 2010).

Em levantamento realizado por Fassett et al. (2010), é possível observar que, entre 14 publicações listadas com doenças renais crônicas, seis destas concluem que o uso de AGPI n-3 não influencia a função renal, proteinúria ou taxa de filtração glomerular (TFG). Em outras três publicações, há relato de melhora da função renal e as cinco restantes concluem que a resposta ao uso de AGPI n-3 revelou-se discreta e sugerem que esta resposta possa ser dose-dependente.

Neumayer et al. (1992) observaram queda na TFG (mensurada por clearance de inulina e de creatinina) em 24 horas em cães previamente suplementados com AGPI n-3 por 6 semanas e submetidos à isquemia renal; contudo, houve melhora da TFG após 72 horas pós operatória – sem normalização - nos animais suplementados, o que não foi observado nos animais do grupo Controle deste estudo.

Fernandez et al. (2004) observaram melhora significativa na TFG de ratos com caquexia do câncer tratados com AGPI n-3, quando comparados aos animais não tratados, não sendo possível determinar se a melhora da TFG ocorreu por nefroproteção devido ação renal direta ou renal indireta relacionada à redução da taxa de crescimento tumoral.

Ainda, Hassan e Gronert (2009), observaram que ratos submetidos a isquemia quente por 30 minutos, suplementados 4 semanas previamente, não mostraram aumentos dos valores plasmáticos de creatinina no pós operatório de 24 horas mas em isquemia de 45 minutos houve aumento significativo dos valores de creatinina no mesmo período, quando comparados com grupo controle. Foi observada ainda correlação positiva entre nefroproteção à injúria renal isquêmica e redução das concentrações de citocinas, quimiocinas e eicosanóides e redução do recrutamento de leucócitos polimórficos.

Conforme discute Fassett et al. (2010), os resultados encontrados neste estudo podem ter sofrido influência do número populacional da amostra, da proporção de EPA e DHA na forma de suplementação escolhida e até mesmo da dose utilizada. A dose recomendada para humanos é de 0,2-0,5 g de EPA + DHA por dia (ARAB-TEHRANY et al., 2012), e os ratos deste estudo receberam 0,12 g.dia<sup>-1</sup> aproximadamente.

O óleo de peixe é 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 (formas de aldeídos) capazes de realizar ligações covalentes com ácidos nucleicos. Em nosso estudo, o manejo de administração não interferiu no resultado, pois o ácido graxo administrado não entrou em contato com as mãos do pesquisador e foi administrado imediatamente após a retirada, de forma estéril, de dentro da cápsula. Segundo Pacheco (2005), o processo oxidativo dos ácidos graxos EPA e DHA ocorre em 3 a 5 dias após contato com oxigênio mesmo abrigados da luz.

Muitos autores (CLARK et al., 1991; DE CATERINA et al., 1993; HOLM et al., 2001; LAURETANI et al., 2009; LIU et al., 2011) sugerem os efeitos benéficos do uso de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (EPA e DHA) sobre a função renal quando associados à doença renal hipertensiva e a distúrbios cardio-circulatórios crônicos (FASSETT et al., 2010), ou seja, lesões renais crônicas, progressivas, de caráter inflamatório, com patofisiologia diversa à aplicada neste estudo. Portanto, não podem ser descritas como antagonicas aos resultados encontrados.

Doenças renais agudas incluem um grupo heterogêneo de causas e alterações metabólicas secundárias, por este motivo, apresentam necessidades terapêuticas medicamentosas e de suporte diferentes, bem como suporte nutricional individualizado, tanto em termos quantitativos, como qualitativos, com cuidado para não sub-alimentar ou super-alimentar o paciente. Como a terapia com a suplementação com ácidos graxos é considerada uma terapia nutracêutica, não é possível desprezar os efeitos farmacológicos possíveis decorrentes de sua ação individual e a interação medicamentosa nos pacientes (FICCADORI et al., 2013).

Ainda, sabe-se que toda reação inflamatória após injúria aguda será seguida de uma fase de reparação tissular. Questiona-se, neste momento, se a ação antiinflamatória do AGPI n-3 possa interferir de forma negativa nesta fase de reparação. Isto pode não ocorrer nas doenças crônicas, justamente por ser o fator inflamatório crônico implicado como principal fator de progressão em muitas destas doenças.

Ao comparar os grupos suplementados com o grupo controle houve diferença estatística no grupo G2, que recebeu óleo de peixe rico em ácido graxo poliinsaturado ômega 3 após instituída a lesão. Observou-se portanto que a administração de AGPI n-

3 (EPA:DHA de 2:1) prévia a lesão pode não ter impacto sobre a função renal; porém, o aspecto negativo do seu uso após instituída a isquemia deve ficar aqui ressaltado.

### **3.3.2 Análise histopatológica**

As células epiteliais tubulares proximais são especialmente susceptíveis à injúria de isquemia e reperfusão, levando à necrose tubular aguda. Lesões subletais levam à perda de polaridade e adesão celular, resultando em migração de células para a luz tubular e obstrução (LIEBERTHAL, JERROLD, 1996). A avaliação histopatológica de lesões tubulares pode ser feita de diferentes formas. Bagetti-Filho et al. (2012) utilizaram metodologia desenvolvida por Scherle (1970), avaliando o número de glomérulos por mm<sup>3</sup>, e destacou a importância da contagem uma vez que os glomérulos não podem ser regenerados. No entanto, o método é subjetivo uma vez que os campos são aleatoriamente escolhidos, podendo não representar de forma efetiva a real lesão ocorrida. Diversas pesquisas avaliam as lesões tubulares, especialmente em túbulo contornado proximal, apresentando os resultados da avaliação histopatológica por meio de um escore, mas não há padronização de um único método de análise. Descritos na literatura, encontra-se ao menos 6 formas diferentes de se avaliar as lesões renais. Raman et al. (2011) avaliaram histopatologicamente rins de ratos isquemiados por diferentes períodos, seguindo um escore de 0 (0% de lesão) a 3 (75% de lesão). Já Sabbagh et al. (2011) apresentaram apenas a histologia descritiva, justificando o pequeno tamanho das amostras, obtidas por biópsia renal. Cock et al. (2004) descreveram a utilização de escala de classificação humana, específica para análise histopatológica pós transplante, denominada escala de Banff'97, para a avaliação histopatológica de rins transplantados em gatos. E ainda, Yamaki et al. (2012) descreve a utilização da escala de classificação de Shih et al. (1988), que avalia em escores de 0 a 4 lesões túbulo-intersticiais.

Apesar da diversidade das análises permanecer até os dias atuais, em 2009, na tentativa de uniformizar um escore para avaliação da isquemia renal, Tirapelli et al. (2009) compararam dois modelos histopatológicos, propostos por Jablonski et al.

(1983) e Goujon et al. (1999). Ambas estas escalas propõem-se a avaliar lesões tubulares. A escala de Goujon et al (1999) analisa 8 alterações morfológicas: (1) vacuolização citoplasmática tubular, (2) necrose tubular, (3) dilatação tubular, (4) descolamento celular tubular, (5) integridade da bordadura em escova, (6) edema intracelular, (7) desnudação da membrana basal e (8) integridade mitocondrial, devendo-se atribuir a cada um dos critérios um escore de 1 a 5 conforme a abrangência das lesões observadas na lâmina, sendo 1 – sem alterações, 2 – lesões brandas acometendo menos de 10% da lâmina, 3 – 25% de lesão, 4 – 50% de lesão e 5 – 75% ou mais de lesão. Na escala de Goujon et al. (1999) os parâmetros edema intracelular e integridade mitocondrial requererem microscopia eletrônica para análise e por este motivo não foram avaliados no trabalho. Mesmo assim, os autores concluíram que o escore modificado proposto por Goujon et al. (1999) permitiu maior acurácia e melhor descrição do grau de lesão renal pós isquemia porque os parâmetros foram avaliados de forma mais detalhada.

Para evitar análise subjetiva e sem critérios pré-estabelecidos, ineficazes para comprovar a presença de lesão tubular renal, adotou-se neste estudo adaptação da escala de Goujon et al. (2009) para padronização das lesões histopatológicas encontradas. Os escores atribuídos a cada um dos critérios em seus respectivos grupos e momentos pós-operatórios estão descritas no APÊNDICE B. Fotomicrografias das lesões histopatológicas tubulares observadas neste estudo estão exemplificadas nas figuras 10, 11 e 12 a seguir.

Figura 10. Fotomicrografia de rins de ratos wistar submetidos à isquemia renal quente por 30 minutos. **A** – Dilatação tubular de diversas magnitudes (HE 100x) (Rato 7, Grupo Controle no momento 24 horas); **B** – Infiltrados inflamatórios mononucleares (setas) (HE 100x) (Rato 6, Grupo 1 no momento 30 dias).

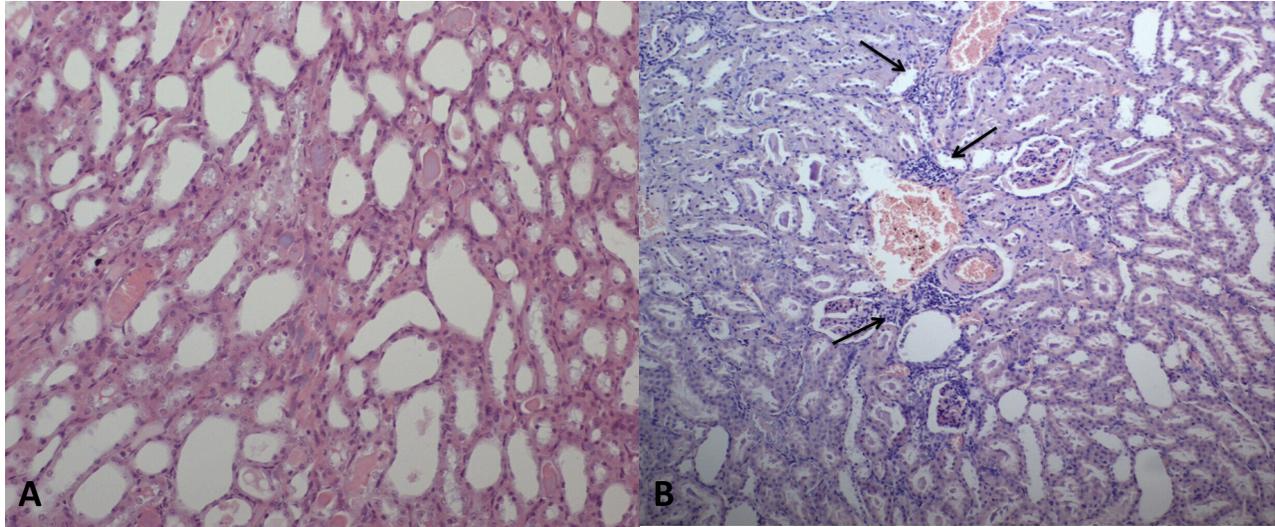


Figura 11. Fotomicrografia de rins de ratos wistar submetidos à isquemia renal quente por 30 minutos. **C** – Necrose tubular aguda, destaca-se núcleo picnótico (seta cheia), células necróticas se projetando para a luz do túbulo (seta pontilhada), dilatação e obstrução tubular (HE 400x) (Rato 3, Grupo 2 no momento 30 dias); **D** – Acúmulo de material eosinofílico na luz tubular (setas) (HE 200x) (Rato 9, Grupo Controle no momento 24 horas).

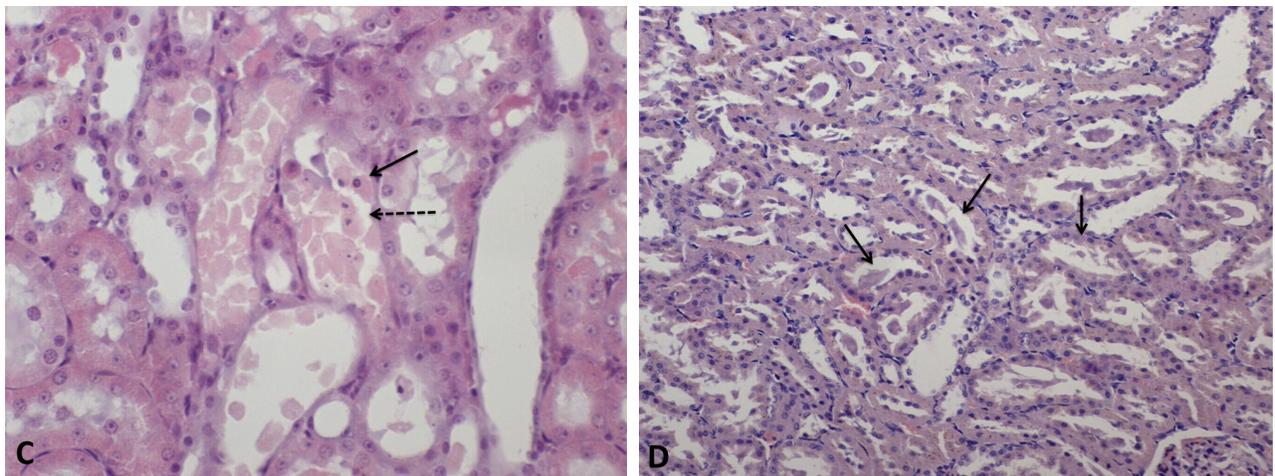
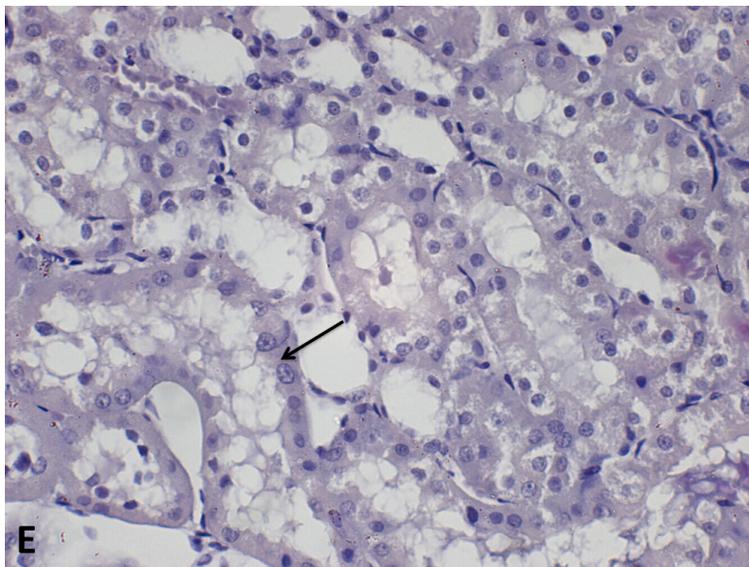


Figura 12. Fotomicrografia de rins de ratos wistar submetidos à isquemia renal quente por 30 minutos. **E** – Intensa vacuolização das células tubulares, desarranjo celular e obstrução da luz do túbulo (HE 400x) (Rato 3, Grupo 2 no momento 30 dias).



Avaliando-se cada critério individualmente, e comparando-se os grupos controle, G1, G3 e rins direitos normais (N) no momento 24 horas, não observou-se diferença estatística entre os grupos analisados, mesmo entre rim esquerdo (com isquemia) quando comparado ao rim direito (sem isquemia). O mesmo aconteceu no momento 30 dias, comparando-se o grupo controle, G1, G2, G3 e N.

É necessário destacar que ao observar os escores atribuídos aos critérios em cada grupo individualmente, é possível notar que os menores escores de lesão estão presentes no grupo N, revelando, desta forma, que o rim direito, não submetido à lesão isquêmica, apresentou menos lesões, mesmo que estatisticamente esta diferença não tenha sido revelada.

Sabe-se que a hipóxia é capaz de interferir nos dois mecanismos de auto-regulação da taxa de filtração glomerular: o reflexo miogênico e o de retroalimentação tubuloglomerular e que a alteração no tônus vasomotor refletir-se-á na distribuição de oxigênio aos segmentos tubulares, contribuindo ainda mais para a hipóxia e lesão tubular adicional (BONVENTRE, YANG, 2011; COWGILL, LANGSTON, 2011).

Portanto, a despeito da ausência da análise da estrutura glomerular neste estudo e da quantificação ou qualificação das lesões endoteliais, os achados das lesões tubulares poderiam ser suficientes para justificar as alterações na taxa de filtração glomerular, mensurada pela creatinina plasmática.

Considerando os demais critérios de avaliação das alterações histopatológicas, observa-se que estas assemelharam-se em todos os grupos e nos momentos 24 horas e 30 dias - o que não aconteceu com as concentrações plasmáticas de creatinina, que revelaram alterações mais significativas no momento 24 horas quando comparados ao momento 30 dias. Lembrando que 72% dos animais apresentaram aumento da concentração plasmática de creatinina no momento 24 horas, contra 8% do momento 30 dias. Considerando esta observação, não é possível correlacionar o grau de lesão histológica com a alteração da taxa de filtração mensurada pela creatinina plasmática neste estudo. E ainda, revelando que a abrupta redução da massa funcional renal seja a verdadeira responsável pelo aumento significativo das concentrações de creatinina plasmática e não as alterações tubulares ligadas à isquemia e reperfusão.

Os escores de cada critério foram somados em cada um dos animais, conferindo uma pontuação individual. A pontuação individual foi somada dentro dos grupos, conferindo uma pontuação global do grupo, tanto no momento 24 horas, quanto no momento 30 dias, como demonstrado na figura 13 a seguir.

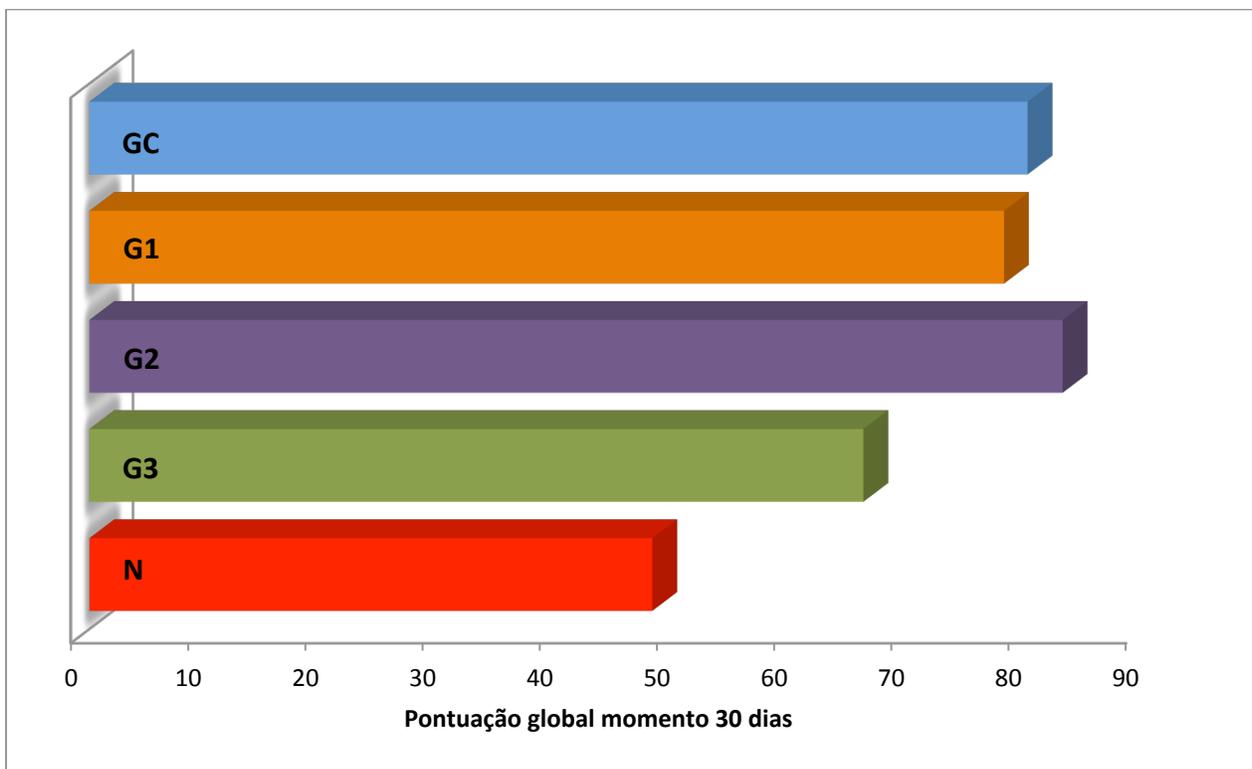


Figura 13. Pontuação global dos escores de lesão histopatológica em cada grupo, no momento 30 dias pós-operatório, considerando-se N – grupo normal (rim direito sem isquemia e sem suplementação), GC – grupo controle (rim esquerdo submetido à isquemia quente por 30 minutos, sem suplementação de AGPI n-3), G1 (rim esquerdo submetido à isquemia quente por 30 minutos, com suplementação de AGPI n-3 por 30 dias pré-operatório) e G3 (rim esquerdo submetido à isquemia quente por 30 minutos, com suplementação de AGPI n-3 por 30 dias pré e 30 dias pós-operatório).

No momento 30 dias pós-operatório, observando-se o escore global de cada grupo é possível verificar que em comparação com o grupo N, considerado rim normal, o GC apresenta aproximadamente 67% a mais de lesão, enquanto o G1 apresenta aproximadamente 63% de lesão, já o G2 apresenta aproximadamente 73% a mais de lesão e finalmente, que o G3 apresenta aproximadamente 38% de lesão a mais.

Fazendo a mesma análise no momento 24 horas é possível observar que em comparação com rim normal, o grupo controle apresentou aproximadamente 67% a mais de lesão, o G1 apresentou 50% a mais de lesão e o G3 apresentou 53% a mais de lesão. Demonstrando valores de escore de lesão muito próximos, verifica-se que o

uso de AGPI n-3 não foi capaz de conferir nefroproteção à morfologia tubular, no momento 24 horas, nos animais suplementados.

Acredita-se que o tempo de 30 minutos utilizado para a isquemia quente neste estudo possa ter sido determinante para preservação morfológica das células tubulares.

### 3.4 CONCLUSÃO

Neste estudo, pode-se concluir que a utilização de  $1\text{g.Kg}^{-1}$  de ácido graxo poliinsaturado ômega 3 em ratos wistar adultos submetidos à isquemia renal quente por 30 minutos seguida de nefrectomia contralateral, não ofereceu nefroproteção quanto a função de filtração glomerular, mensurada pela creatinina plasmática, nos animais suplementados previamente quando comparados ao grupo controle, e ainda, revelou impacto negativo nos animais suplementados posteriormente à isquemia quando comparados com grupo controle.

Pode-se concluir também que o uso de AGPI n-3 não conferiu nefroproteção quanto às lesões renais tubulares de isquemia e reperfusão em qualquer um dos grupos suplementados neste estudo.

## CAPÍTULO 4

### 4 CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que não existem diferenças histológicas ou funcionais entre os animais suplementados com AGPI n-3, seja esta suplementação somente prévia, somente posterior ou ambas - prévia e posterior, à lesão de isquemia e reperfusão renal provocada pela técnica de isquemia quente em ratos, rejeitando desta forma a hipótese inicial deste estudo e demonstrando que seu uso como nutracêutico profilático ou terapêutico não trará benefícios aos pacientes que o utilizem objetivando a nefroproteção pré-cirúrgica.

Sabendo-se da importância em minimizar as lesões renais ligadas ao procedimento de isquemia quente, sugere-se a pesquisa da utilização de agentes bloqueadores de canais de cálcio, visando reduzir a captação deste eletrólito na fase de reperfusão e buscando minimizar a deflagração dos eventos inflamatórios e de lesões tissulares em cascata ligados à reperfusão.

## REFERÊNCIAS

1. ADIN, C.A.; SCANSEN. B.A. Complications of Upper Urinary Tract Surgery in Companion Animals. **Veterinary Clinics of Small Animal**. v. 41, p.869-888, 2011.
2. 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.
3. ALEXANDER, J.W. Immunonutrition: the role of n-3 fatty acids. **Nutrition**, v. 14, p.627-633, 1998.
4. AN, W.S.; KIM, H.J.; CHO, K.H.; VAZIRI, N.D. Omega 3 fatty acids supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. **American Journal of Physiology Renal Physiology**. v. 297, p.895-903, 2009.
5. ARAB-TEHRANY, E.; JACQUOT, M.; GAIANI, C.; IMRAN, M.; DESOBRY, S.; LINDER, M. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. **Trends in Food Science & technology**. v. 25, p. 24-33, 2012.
6. BAGETTI-FILHO, H.J.S. Avaliação do parênquima renal em ratos após isquemia-reperfusão por clampeamento arteriovenoso e arterial (Dissertação de mestrado). Rio de Janeiro, RJ: Universidade Estadual do Rio de Janeiro; 2012.
7. BAKER, G.L.; CORRY, R.J.; AUTOR, A.P. Oxygen Free Radical Induced Damage in Kidneys Subjected to Warm Ischemia and Reperfusion, Protective Effect of Superoxidase Dismutase. **Annual Surgery** v. 202, n.5, p. 628-641, 1985.
8. BEHREND, E.N.; GRAUER, G.F.; MANI, I.; GROMAN, R.P.; SALMAN, M.D.; GRECO, D.S. Hospital-acquired acute renal failure in dogs: 29 cases (1983-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 208, n.4, p. 537-541, 1996.
9. BHAYANI, S.B.; RHA, K.H.; PINTO, P.A.; ONG, A.M.; ALLAF, M.E.; TROCK, B.J.; JARRET, T.W.; KAVOUSSI, L.R. Laparoscopic partial nephrectomy: effect of warm ischemia on serum creatinine. **The Journal of Urology**. v. 172, n.4, p.1264-1266, 2004.

10. BONVENTRE, J.V. Mechanisms of ischemic acute renal failure. **Kidney International**. v. 43, p. 1160-1178, 1993.
11. BONVENTRE, J.V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 121, n.11, p.4210-4221, 2011.
12. BRADEN, G.A.; KNAPP, H.R.; FITZGERALD, D.J.; FITZGERALD, G.A. Dietary fish oil accelerates the response to coronary thrombolysis with tissue type plasminogen activator. **Circulation**. v. 82, p.178-187, 1990.
13. BRAUN, J.P.; LEFEBVRE, H.P.; WATSON, D.J. Creatinine in the dog: a review. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 32, p.162-179, 2003.
14. BRONW, S. Physiology of the kidneys. In: BARTGES, J; POLZIN, D.J. **Nephrology and Urology of Small Animals**. 1<sup>st</sup> ed. Nova Deli: Blackwell Publishing, 2011. p. 125-153.
15. CALDER, P.C. Fat chance of immunomodulation. **Trends Immunology Today**. v. 19, n.6, p. 244-277, 1998.
16. CALDER, P.C. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fish tale? **Nutrition Research**, v. 21, p.309-341, 2001.
17. CALDER, P.C.; YAQOUB, P.; HARVEY, D.J.; WATTS, A.; NEWSHOLME, E.A. Incorporation of fatty acids by concanavalin A – stimulated lymphocytes and the effect on fatty acids composition and membrane fluidity. **Biochemical Journal**. v. 300, n. 2, p. 509-518, 1994.
18. CASSINI, M.F. Correlação entre a espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser e as alterações histológicas na isquemia e reperfusão renal em ratos (Tese de doutorado). Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo, 2012.
19. CLARK, W.; PARBTANI, A.; PHILBRICK, D.J.; HOLUB, B.J.; HUFF, M.W. Chronic effects of  $\omega$ 3 fatty acids (fish oil) in a rat 5/6 renal ablation model. **Journal of the american society of nephrology**. v.1, p.1343-1353, 1991.
20. COWGILL, L.D.; LANGSTON, C. Acute kidney insufficiency. In: BARTGES, J; POLZIN, D.J. **Nephrology and Urology of Small Animals**. 1<sup>st</sup> ed. Nova Deli: Blackwell Publishing, 2011. p.472-523.

21. D'ALESSANDRO, P.; DASON, S.; KAPOOR, A. Laparoscopic Partial Nephrectomy – Current State of the art. In: AMATO, R. **Emerging Research and Treatments in Renal Cell Carcinoma**. Ontario: Hard Cover, 2012, p.245-272.
22. DE CATERINA, R.; CAPRIOLI, R.; GIANNESI, D.; SICARI, R.; GALLI, C.; LAZZERINI, G.; BERNINI, W.; CARR, L.; RINDI, P. n-3 fatty acids reduce proteinuria in patients with chronic glomerular disease. **Kidney International**. v. 44, p.843-850, 1993.
23. DE COCK, H.E.V.; KYLES, A.E.; GRIFFEY, S.M., BERNSTEEN, L.; GREGORY, C.R. Histopathologic findings and classification of feline renal transplants. **Veterinary Pathology**. v. 41, p.244-256, 2004.
24. DERAJAVAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 17, p. 1503-1520, 2006.
25. EVORA, P.R.B.; PEARSON, P.J.; SECCOMBE, J.F.; SCHAFF, H.V. Lesão de isquemia-reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 66, n.4, p. 239-245, 1996.
26. FASSETT, R.G.; GOBE, G.C.; PEAKE, J.M.; COOMBES, J.S. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of kidney disease. **American Journal of Kidney Disease**. v.56, n.4, p.728-742, 2010.
27. FERNANDEZ, R.; PIECHNIK, J.; FABRIS, R.; MALNIC, G.; FERNANDES, L.C. Effect of chronic fish oil supplementation on renal function of normal and cachectic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37, p.1481-1489, 2004.
28. FIACCADORI, E.; REGOLISTI, G.; MAGGIORE, U. Specialized nutritional support interventions in critically ill patients on renal replacement therapy. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. v. 16, p.000-000, 2013.
29. FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J.B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W.B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 25, n.4, p.575-584, 2010.
30. GLAVES, D., HUBEN, R.P., WEISS L. Haematogenous dissemination of cells from human renal adenocarcinomas. **Brazilian Journal of Cancer**. v.57, n.1, p.32-35, 1988.

31. GOUJON, J.M.; HAUET, T.; MENET, E.; LEVILLAIN, P.; BABIN, P.; CARRETIER, M. Histological evaluation of proximal tubule cell injury in isolated perfused pig kidney exposed to cold ischemia. **Journal of Surgery Research**. v.82, n.2, p.228-233, 1999.
32. GUYTON A.C.; Formação de urina pelos rins: I. Fluxo sanguíneo renal, filtração glomerular e seu controle. In: GUYTON, A.C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 1996. p. 248-257.
33. HALAZUN, K.J.; AL-MUKHTAR, A.; ALDOURI, A.; WILLIS, S.; AHMAD, N. Warm ischemia in transplantation: search for a consensus definition. **Transplantation Proceedings**. v.39, n.5, p.1329-1331, 2007.
34. Harkness JE; Wagner JE. Biologia e clínica de coelhos e roedores. 3<sup>nd</sup> ed. São Paulo: Editora Rocca, 1993, 238p.
35. HARRIS, W.S. N-3 fatty acids and serum lipoproteins: Animal studies. **American Journal Clinical Nutrition**. v.65, n.5, p.1611-1616,1997.
36. HASSAN, I.R.; GRONERT, K. Acute changes in dietary omega-3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids have a pronounced impact on survival pos ischemic renal injury and formation of renoprotective decosahexaenoic acid-derived protection D1. **Journal of Immunology**. v.182, n.5, p.3223-3232, 2009.
37. HAUGE, T.A.; CHRISTOFFERSEN, B.O. Effects of dietary fats on arachidonic acid and eicosapentaenoic acid biosynthesis and conversion of C22 fatty acids in isolated liver calls. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 796, p. 205-217, 1984.
38. HELLEGERING, J.; VISSER, J.; KLOKE, K.J.; DÁNCONA, F.C.H.; HOITSMA, A.J. VAN DER VLIET, J.J.; WARLÉ, M.C. Deleterious influence of prolonged warm ischemia in living donor kidney transplantation. **Transplantation Proceedings**. v.44, n.5, p.1222-1226, 2012.
39. HOLM, T.; ANDREASSEN, A.K.; AUKRUST, P.; ANDERSEN,K.; GEIRAN, O.R.; 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**. v.22, p.428-436, 2001.

40. HOLT, P.E. Outras causas de hematuria. In: HOLT, P.E. **Urologia em Cães e Gatos – Exames, diagnóstico e tratamento**. 1<sup>st</sup> ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2011. P.123-133.
41. HOSTE, E.A.J.; CLERMONT, G.; KERSTEN, A.; VENKATARAMAN, R.; ANGUS, D.C.; BACQUER, D.; KELLUM, J.A. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. **Critical Care**. v.10, n.3, p. available online, 2006.
42. JABLONSKI, P.; HOWDEN, O.; RAE, D.A.; BIRREL, C.S. MARSHALL, V.C.; TANGE, J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. **Transplantation**. v.35, n.3, p.198-204, 1983.
43. KELLEY, D.S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. **Nutrition**, v. 17, p. 669-673, 2001.
44. KERL, M.E. Recognition and Classification of acute kidney injury in the ICU. Anais do American College of Veterinary Internal Medicine Forum & Canadian veterinary Medical Association Convention; 3-6 Junho 2009; Montreal, Quebec. p. 650-652.
45. LARANJA, S.M.R.; BOIM, M.A.; SCHOR, N. IRA isquêmica: necrose tubular aguda. In: SCHOR, N.; BOIM, M.A.; DOS SANTOS, O.F.P. **IRA – Insuficiência renal aguda**. 1<sup>st</sup> ed. São Paulo: Savier, 1997. p. 143-162.
46. LANE, B.R.; GILL, I.S.; FERGANY, A.F.; LARSON, B.T.; CAMPBELL, S.C. Limited warm ischemia during elective partial nephrectomy has only a marginal impact on renal function outcomes. **The Journal of Urology**. v.185, n.5, p.1598-1603, 2011.
47. LAURETANI, F.; MAGGIO, M.; PIZZARELLI, F.; MICHELASSI, S.; RUGGIERO, C.; CEDA, G.P.; BANDINALLI, S.; FERRUCCI, L. Omega-3 and renal function in older adults. **Current Pharmaceutical Desing**. v.15, n.36, p.4149-4156, 2009.
48. LENNON, S.; MARTIN, S.; COTTER, T. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Proliferation** v.24, n.2, p.203-214, 1991.
49. LIEBERTHAL, W.; LEVINE, J.S. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. **American Journal of Physiology: Renal Physiology** v.271, p.477-488, 1996.

50. LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.37, n.4, p.293-303, 2001.
51. LIU, J.C.; CONKLIN, S.M.; MANUCK, S.B.; YAO, J.K.; MULDOON, M.F. Long-chain omega 3 fatty acids and blood pressure. **American Journal of Hypertension**. v.24, n.10, p.1121-1126, 2011.
52. 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 2 diabetes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.329, n.1, p.324-334, 2009.
53. MEYER, F.; SILVA, D.S.; BOMBONATTO, G.M.; LIZANA, J.N.; DZIEDRICKI, L.F.; KRIEGER, M.L. Histological analysis and the blood flux in kidneys submitted to different periods of ischemia-reperfusion. **Acta Cirurgica Brasileira**. v.26, n.6, p.451-455, 2011.
54. MIYASAKA, C.K.; MANCINI, J.; LAJOLO, F.M.; CURI, R. Implicações clínicas e nutricionais dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 dos óleos de peixe. **Laes & Haes**, São Paulo, v. 1, n. 98, p.68-75, 1996.
55. MORI, T.A.; BURKE, V.; PUDDEY, I.B.; IRISH, A.B.; COWPLAND, C.A., BEILIN, L.J.; DOGRA, G.K.; WATTS, G.F. The effects of  $\omega$  3 fatty acids and coenzyme Q10 on blood pressure and heart rate in chronic kidney disease: a randomized controlled trial. **Journal of Hipertension**. v.27, p.1863-1872, 2009.
56. MORAES, F.P., COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.3, n.2, p.109-122, 2006.
57. MOTA, P.C. Indicações actuais para biópsia renal. **Acta Médica Portuguesa**. v.18, p.147-151, 2005.
58. NEUMAYER, H.H.; HEINRICH, M.; SCHIMSSAS, M.; HALLER, H.; WAGNER, K.; LUFT, F.C. Ameliorates of ischemic acute renal failure by dietary fish oil administration in conscious dogs. **Journal of the American Society of Nephrology**. v.3, p.1312-1320, 1992.

59. NOLAN, C.R.; ANDERSON, R.J. Hospital-acquired acute renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**. v.1, p.710-718, 1998.
60. PACHECO, S.G.A. Estabilidade oxidativa de óleo de peixe encapsulado e acondicionado em diferentes tipos de embalagens em condição ambiente (Dissertação de mestrado). Piracicaba, SP: Universidade de São Paulo; 2005.
61. PADANILAM, B.J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v.157, n.5, p.608-627, 2003.
62. PARK, Y.; HIROSE, R.; DANG, K.; XU, F.; BEHREND, M.; TAN, V.; ROBERTS, J.P.; NIEMANN, C.U. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in rat model. **Surgery**. v.143, n.2, p.243-251, 2008.
63. POULIOT, F.; PANTUCK, A.; IMBEAULT, A.; SHUCH, B.; CALIMLIM, B.; AUDET, J.F.; FINLEY, D.S.; DUJARDIN, T. Multivariate analysis of the factors involved in loss of renal differential function after laparoscopic partial nephrectomy: a role for warm ischemia time. **Canadian Urological Association Journal**. v.5, n.2, p.89-95, 2011.
64. RAMAN, R.N.; PIVETTI, C.D.; RAMSAMOOJ, R.; MATTHEWS, D.L.; DEMOS, S.G.; TROOPMANN, C. Factors influencing rat survival in a warm renal ischemia time to adapt the protocols. **Transplantation Proceedings**. v.43, p.1511-1514, 2011.
65. RIESER, T.M. Urinary Tract Emergencies. **Veterinary Clinics of Small Animal**. v.35, p.359-373, 2005.
66. ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, p.217-244, 1999.
67. SABBAGH, R.; CHAWLA, A.; TISDALE, B.; KAWAN, K.; CHATTERJEE, S.; KWIECIEN, J.M. Renal histopathology features according to various warm ischemia times in porcine laparoscopic and open surgery model. **Canadian Urological Association Journal**. v.5, n.1, p.40-43, 2011.

68. SCHIER, R.W.; WANG, W.; POOLE, B.; MITRA, A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **The Journal of Clinical Investigation**. v.114, n.1, p.5-14, 2004.
69. SHEKARRIZ, B.; SHAH, G.; UPADHYAY, J. Impact of temporary hilar clamping during laparoscopic partial nephrectomy on postoperative renal function: a prospective study. **The Journal of Urology**. v.172, n.1, p.54-57, 2004.
70. SHIH, W.; HINES, W.H.; NEILSON, E.G. Effects of cyclosporine A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. **Kidney International**. v.33, n.6, p.1113-1118, 1998.
71. SIEDLECKI, A.; IRISH, W.; BRENNAM, D.C. Delayed graft function in the kidney transplant. **American Journal of Transplantation**. v.11, p.2279-2296, 2011.
72. SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W.B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismo de lesão e perspectivas de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**. v.3, n.4, p.367-378, 2004.
73. SIMMONS, M.N.; FERGANY, A.F.; CAMPBELL, S.C. Effect of parenchymal volume preservation on kidney function after partial nephrectomy. **The Journal of Urology**. v.2, p.405-410, 2011.
74. SIMMONS, M.N.; LIESER, G.C.; FERGANY, A.F.; KAOUK, J.; CAMPBELL, S.C. Association between warm ischemia time and renal parenchymal atrophy after partial nephrectomy. **Journal of Urology**. v.189, available online, 2012.
75. SIMMONE, M.N.; SCHREIBER, M.J.; GILL, I.S. Surgical renal ischemia: a contemporary overview. **Journal of Urology**. v.180, n.1, p.19-30, 2008.
76. SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.
77. THOMPSON, R.H.; LANE, B.R.; LOHSE, C.M.; LEIBOVICH, B.C.; FERGANY, A.; FRANK, I.; GILL, I.S.; BLUTE, M.L.; CAMPBELL, S.C. Comparison of warm ischemia versus no ischemia during partial nephrectomy on a solitary kidney. **European Urology**. v. 58, n.3, p.331-336, 2010.
78. THOMPSON, R.H.; LANE, B.R.; LOHSE, C.M.; LEIBOVICH, B.C.; FERGANY, A.; FRANK, I.; GILL, I.S.; BLUTE, M.L.; CAMPBELL, S.C. Renal function after partial

- nephrectomy: effect of warm ischemia relative to quantity and quality of preserved kidney. **Urology**. v.79, n.2, p.356-360, 2012.
79. TIRAPELLI, L.F.; BARIONE, D.F.; TRAZZI, B.F.M.; TIRAPELLI, D.P.C.; NOVAS, P.C.; SILVA, C.S.; MARTINEZ, M.; COSTA, R.S.; TUCCI JUNIOR, S.; SUAID, H.J.; COLOGNA, A.J.; MARTINS, A.C.P. Comparison of two models for evaluation histopathology of experimental renal ischemia. **Transplantation Proceedings**. v.41, p.4083-4087, 2009.
80. VADEN, S.L. Renal biopsy: methods and interpretation. **Veterinary Clinics of Small Animal**. v.34, p.887-908, 2000.
81. VAIDYA, V.S.; FERGUSON, M.A.; BONVENTRE, J.V. Biomarkers of acute kidney injury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v.48, p.463-493, 2008.
82. VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000, 1260p.
83. YU, L.; BURDMANN, E.; SEGURO, A.C.; HELOU, C.M.B.; ZATZ, R. Insuficiência renal aguda. In: ZATZ, R. **Fisiopatologia renal**. 2<sup>ed</sup>. São Paulo: Editora Atheneu. 2002, p. 261-282.
84. WAITZBERG, D.L. Ômega-3: o que existe de concreto? [Internet]. [Local Desconhecido]: Nutritotal; 2009 [atualizado em 04 Maio 2009; citado em 11 Julho 2012]. Disponível em: <http://www.nutritotal.com.br/publicacoes/files/644--MonografiaOmega3.pdf>
85. WOODMAN, R.J.; MORI, T.A.; BURKE, V.; PUDDEY, I.B.; BARDEN, A.; WATTS, G.F.; BEILIN, L. Effects of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on platelet, fibrinolytic and vascular function in hypertensive type 2 diabetic patients. **Atherosclerosis**. v.166, n.1, p.85-93, 2003.
86. WORWANG. S.; LANGSTON, C.E. Acute intrinsic renal failure in cats: 32 cases (1997-2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.232, n.5, p.728-732, 2008.
87. WSZOLEK, M.F.; KENNEY, P.A.; LIBERTINO, J.A. Nonclamping partial nephrectomy: towards improved nephron sparing. **Nature Reviews Urology**. v.8, p.523-527, 2011.

88. ZORZENON, C.P.F.; SANTOS, N.Y.; ARAÚJO, M.F.; BALBI, A.L.; PONCE, D. Injúria renal aguda em unidade de terapia intensiva – estudo prospectivo sobre a incidência, fatores de risco e mortalidade [Internet]. [Local Desconhecido]. São Paulo; 2008 [citado 11 Fevereiro 2013]. Disponível em: [prope.unesp.br/xxi\\_cic/27\\_35884297866.pdf](http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_35884297866.pdf).

APÊNDICE A. Tabulação dos dados: concentração de creatinina plasmática nos momentos pré e pós operatório em cada grupo nos momentos 24 horas e 30 dias, Diferença aritmética e variação percentual ( $\Delta$  %) entre os valores pós e pré operatórios de creatinina plasmática em cada grupo e classificação de cada animal segundo sistema RIFLE para IRA.

RATO	24 horas					30 dias				
	Grupo Controle									
	Pré	Pós	(Pós - Pré)	$\Delta$ %	RIFLE	Pré	Pós	(Pós - Pré)	$\Delta$ %	RIFLE
1						1,01	0,66	-0,35	-35	-
2						0,69	0,91	0,22	32	-
3						0,74	0,84	0,1	14	-
4						0,75	0,87	0,12	16	-
5						0,7	0,62	-0,08	-11	-
6						0,67	0,68	0,01	1	-
7	0,72	1,53	0,81	113	R					
8	0,69	0,88	0,19	28	-					
9	0,6	2,29	1,69	282	I					
10	0,69	1,4	0,71	103	R					
11	0,71	1,27	0,56	79	R					
12	0,6	1,09	0,49	82	R					
	Grupo 1									
1						0,81	0,94	0,13	16	-
2						0,69	0,89	0,2	29	-
3						0,65	0,92	0,27	42	-
4						0,69	0,86	0,17	25	-
5						0,71	0,83	0,12	17	-
6						0,93	0,97	0,04	4	-
7	1,37	0,96	-0,41	-30	-					
8	0,68	0,95	0,27	40	-					
9	0,94	1,37	0,43	46	R					
10	0,66	1,03	0,37	56	R					
11	0,69	3,34	2,65	384	F					
12	0,74	1,38	0,64	86	R					

RATO	24 horas					30 días				
	Grupo 2									
	Pré	Pós	(Pós - Pré)	Δ %	RIFLE	Pré	Pós	(Pós - Pré)	Δ %	RIFLE
1						0,68	1,21	0,53	78	R
2						0,69	0,84	0,25	22	-
3						0,76	1,02	0,26	34	-
4						0,69	0,93	0,24	35	-
5						0,68	0,88	0,2	29	-
6						0,63	0,84	0,21	33	-
7	0,72	1,53	0,81	113	R					
8	0,69	0,88	0,19	28	-					
9	0,6	2,29	1,69	282	I					
10	0,69	1,4	0,71	103	R					
11	0,71	1,27	0,56	79	R					
12	0,6	1,09	0,49	82	R					
	Grupo 3									
1						0,68	0,86	0,2	26	-
2						0,72	0,89	0,17	24	-
3						0,7	0,87	0,17	24	-
4						0,73	0,81	0,08	11	-
5						0,71	0,8	0,09	13	-
6						0,51	0,87	0,36	71	R
7	0,65	0,66	0,01	2	-					
8	0,7	0,96	0,26	37	-					
9	0,66	1	0,34	52	R					
10	0,67	1,16	0,49	73	R					
11	0,68	1,11	0,43	63	R					
12	0,6	1,18	0,58	97	R					

APÊNDICE B. Tabulação dos escores de lesão histopatológica tubular nos momentos 24 horas e 30 dias, em cada grupo: GC, G1, G2, G3 e N.

<b>30 dias</b>	<b>Grupo controle</b>					
<b>Critério</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>
<b>Vacuolização</b>	4	3	4	2	3	3
<b>Necrose tubular</b>	3	2	3	3	3	1
<b>Descolamento</b>	3	2	3	1	1	1
<b>Dilatação</b>	2	3	2	2	2	2
<b>Mat eosinofílico</b>	1	2	3	1	2	3
<b>Inflamação</b>	1	2	1	2	2	2
<b>30 dias</b>	<b>Grupo 1</b>					
<b>Critério</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>
<b>Vacuolização</b>	2	3	2	3	4	2
<b>Necrose tubular</b>	3	3	2	2	2	3
<b>Descolamento</b>	2	2	1	1	1	2
<b>Dilatação</b>	3	2	2	2	2	2
<b>Mat eosinofílico</b>	3	3	1	3	4	2
<b>Inflamação</b>	2	1	2	1	1	2

<b>30 dias</b>	<b>Grupo 2</b>					
<b>Critério</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>
<b>Vacuolização</b>	3	3	4	3	3	4
<b>Necrose tubular</b>	1	2	4	3	2	3
<b>Descolamento</b>	2	1	3	3	2	3
<b>Dilatação</b>	2	2	3	2	2	2
<b>Mat eosinofílico</b>	1	2	2	2	3	3
<b>Inflamação</b>	1	1	2	1	1	2
<b>30 dias</b>	<b>Grupo 3</b>					
<b>Critério</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>
<b>Vacuolização</b>	2	2	3	2	3	3
<b>Necrose tubular</b>	2	1	2	2	3	1
<b>Descolamento</b>	1	1	2	1	1	1
<b>Dilatação</b>	2	2	2	2	2	3
<b>Mat eosinofílico</b>	2	2	2	2	2	2
<b>Inflamação</b>	1	1	2	1	2	1

<b>24 horas</b>	<b>Grupo Controle</b>					
<b>Critério</b>	<b>R7</b>	<b>R8</b>	<b>R9</b>	<b>R10</b>	<b>R11</b>	<b>R12</b>
<b>Vacuolização</b>	2	4	3	2	3	3
<b>Necrose tubular</b>	3	2	3	4	2	2
<b>Descolamento</b>	2	1	3	1	3	1
<b>Dilatação</b>	3	2	2	2	2	2
<b>Mat eosinofílico</b>	2	3	4	3	2	3
<b>Inflamação</b>	1	1	1	1	1	1

24 horas	Grupo 1					
Critério	R7	R8	R9	R10	R11	R12
Vacuolização	3	3	3	3	3	3
Necrose tubular	2	1	3	1	4	2
Descolamento	2	2	1	1	1	2
Dilatação	2	2	2	3	3	2
Mat eosinofílico	2	2	2	2	2	2
Inflamação	1	1	1	1	1	1
24 horas	Grupo 3					
Critério	R7	R8	R9	R10	R11	R12
Vacuolização	3	3	3	3	2	3
Necrose tubular	3	1	2	3	2	3
Descolamento	3	1	2	3	1	1
Dilatação	2	2	2	2	2	2
Mat eosinofílico	3	3	2	3	1	1
Inflamação	1	1	1	1	1	1

24 horas	Grupo N					
Critério	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Vacuolização	1	2	1	2	2	2
Necrose tubular	1	1	1	1	1	2
Descolamento	1	1	1	1	1	1
Dilatação	1	2	1	2	3	2
Mat eosinofílico	1	1	1	1	1	1
Inflamação	1	1	1	1	1	1