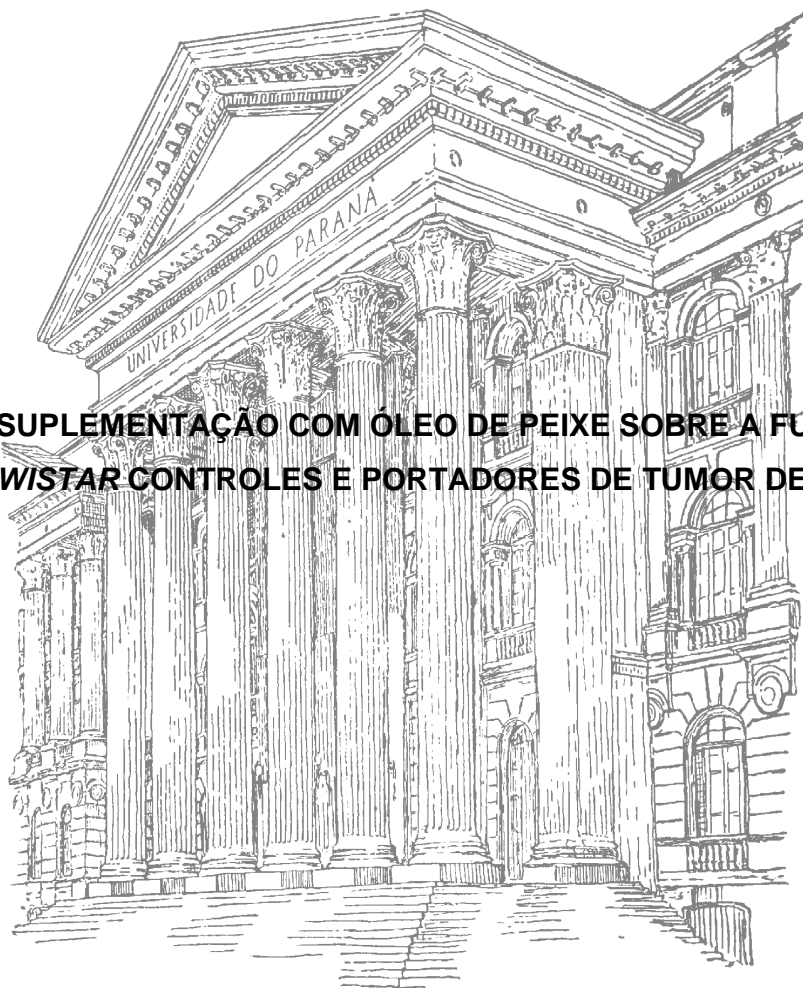


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELA COELHO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE A FUNÇÃO RENAL
DE RATOS Wistar CONTROLES E PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256**



CURITIBA

2010

ISABELA COELHO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE A FUNÇÃO RENAL
DE RATOS *WISTAR* CONTROLES E PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez

CURITIBA

2010

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois nada seria possível.

À minha família, pelo apoio presente em todos os momentos e pelo incentivo educacional que tornou este trabalho possível.

Ao Kleiton, pela compreensão, carinho, amizade e amor dedicados e pela inesgotável paciência comigo.

Ao Prof. Ricardo Fernandez, pela dedicação, orientação, ajuda e por ter aberto seu laboratório para a execução deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos de fisiologia renal e auxílio nos experimentos. A todos do laboratório, Prof^a. Ana Lúcia, por todo apoio, ao Fernando, pela ajuda nos experimentos desde o início e aos estagiários pelo auxílio nas suplementações.

Ao Prof. Luiz Cláudio, pela primeira oportunidade em um laboratório e a todos os amigos que compõe sua equipe: Adri, Andressa, Cíntia, Dalton, Dani, Everson, Gina, Gleisson, Júlia, Juliano, Katya, Marcelo, Pedro, Rica, Ricelli, Sandro e Thiago, por todo auxílio e amizade neste período.

À Prof^a Carolina, pelas dosagens de osmolalidade plasmáticas e urinárias.

À Prof^a Lucélia, pelo auxílio na técnica de microscopia eletrônica.

À Prof^a Terezila M. Coimbra pela atenção e cooperação nos experimentos.

À Fundação Herbarium, por terem cedido gentilmente as cápsulas de óleo de peixe.

Ao CNPq e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram neste trabalho.

*As únicas pessoas que nunca fracassam
são as que nunca tentam.*

Ilka Chase

*A disciplina é a chama refinadora
através da qual o talento se transforma
em capacidade.*

Roy Smith

RESUMO

O desbalanço do consumo de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) n-6 em detrimento dos n-3 gera aumento da produção de substâncias com caráter próinflamatório, pró-trombótico e vasoconstritor o que tem sido associado com a elevada incidência de doenças crônicas de cunho inflamatório. A suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n-3, apresenta efeito positivo sobre diversas patologias, entre elas o câncer, doenças renais e hipertensão essencial. O objetivo deste trabalho foi avaliar a função renal de ratos controles e portadores de tumor de Walker suplementados de forma crônica com óleo de peixe. Foram utilizados ratos *Wistar* machos com 21 dias, recém desmamados. A suplementação com óleo de peixe ou gordura de coco se realizou por 70 dias na dose de 1g/kg p.c., após este tempo os animais foram divididos em dois subgrupos para a inoculação da suspensão de células de tumor de Walker (3×10^7 células/mL) no flanco direito dos animais, com a formação de 6 grupos: controle (C) e os suplementados (COP e CGC), portador de tumor de Walker (W) e os portadores com as duas suplementações (WOP e WGC). Os parâmetros analisados foram: ganho de peso, peso tumoral, peso do rim, filtração glomerular e fluxo plasmático renal, por *clearance* de inulina e para-amino-hipúrico, respectivamente; fluxo urinário, creatinina e uréia plasmáticas, osmolalidade, concentrações plasmáticas e urinárias de proteínas totais e eletrólitos (Na^+ , K^+ e Li), microscopia de luz e eletrônica de transmissão. O manejo tubular de Na^+ foi estudado através do *clearance* de lítio. O óleo de peixe foi capaz de modificar o ganho de peso dos animais e reduzir o crescimento tumoral, diferentemente da suplementação com gordura de coco. A proteinemia dos animais portadores de tumor apresentou redução refletindo a proteólise gerada pela caquexia, sendo que o OP reverteu o quadro, aumentando este parâmetro. A proteinúria, uremia e peso do rim não sofreram modificações nos grupos. O grupo WGC aumentou a creatinina plasmática em relação aos grupos W e CGC. A filtração glomerular, elevou-se no grupo WGC vs W e CGC, e o fluxo plasmático renal apresentou aumento em todos os grupos suplementados COP e CGC vs C e WOP e WGC vs W. A suplementação com gordura de coco ainda reduziu a fração de filtração (CGC vs C). O fluxo urinário não foi modificado por nenhum parâmetro. O grupo W reduziu a osmolalidade plasmática (C vs W) e o WGC aumentou esta variável (WGC vs W). Sobre a dosagem de eletrólitos, somente o grupo WGC aumentou a concentração de K^+ plasmático (WGC vs W). Foi observada uma clara tendência à redução na carga excretada de Na^+ e na FE_{Na^+} no grupo W o que foi revertido nos animais suplementados. O manejo tubular de Na^+ foi modificado somente nos grupos com suplementação com GC, sendo que o grupo CGC apresentou um estímulo na reabsorção proximal de Na^+ (redução do *clearance* de lítio e aumento da RPF_{Na^+}), e o grupo WGC uma redução na reabsorção proximal de Na^+ (aumento significativo da FE_{Li} e uma redução da RPF_{Na^+}). A suplementação com óleo de peixe parece não interferir com a reabsorção de Na^+ neste segmento. As análises relativas à histologia do tecido renal por microscopia de luz e eletrônica de transmissão não apresentaram alterações na presença do tumor ou das suplementações lipídicas. Em resumo, a suplementação com OP reduziu a caquexia dos animais interferindo no crescimento tumoral e teve um efeito renoprotetor ao aumentar o fluxo plasmático renal e preservar a filtração glomerular. A suplementação com GC alterou parâmetros da hemodinâmica renal e manejo tubular de sódio, sendo que a presença do tumor alterou de forma mais

expressiva estes parâmetros.

Palavras-chaves: óleo de peixe, gordura de coco, função renal, câncer.

ABSTRACT

Consumption of high n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) ratio promotes elevated concentration of potential proinflammatory, thrombotic and vasoconstrictor mediators which have been associated with high incidence of chronic disease. Fish oil (FO) supplementation, rich in n-3 PUFA, has a positive effect on various diseases, including cancer, kidney disease and essential hypertension. The objective of this study was evaluate renal function of control rats and tumor-bearing Walker 256 chronically supplemented with fish oil or coconut fat. Weanling male rats were supplemented for 70 days with fish oil and coconut fat (CF) (1g/kg body weight) after this time the animals were divided into two subgroups to proceed the inoculation in the right flank with a suspension of Walker tumor cells (3×10^7 cells/mL), forming 6 groups: control (C), supplemented (FO and CF), tumor-bearing Walker (W), tumor-bearing Walker supplemented (FOW and CFW). The parameters analyzed were: weight gain, tumor weight, glomerular filtration and renal plasma flow (inulin and p-amino-hippuric clearances, respectively), urine flow, plasma creatinine and urea, plasma and urine osmolality, plasmatic and urinary concentration of total protein and electrolytes (Na^+ , K^+ and Li), light and transmission electron microscopy. Tubular sodium handling was studied by lithium clearance. Fish oil was able to modify the weight gain and reduced tumor weight in contrast to the coconut fat supplementation. Tumor-bearing group present a significant reduction of total plasma protein concentration which reflects cachectic proteolysis, and FO supplementation reversed this fact increasing this parameter. All groups did not change urinary protein excretion, uremia or kidney weight. CFW increased plasma creatinine in relation to W and CF. Glomerular filtration raise in CFW group versus W and CGC. Renal plasma flow increased in supplemented groups FO and CF versus C, and FOW and CFW versus W. Moreover, coconut fat supplementation reduced filtration fraction. Urine flow was not changed by experimental groups. W group reduced plasma osmolality (C vs W) and CFW increased this parameter (W vs CFW). About electrolytes measurement, only CFW raised potassium plasma level. There was a clear tendency to reduce Na^+ excreted and fractional sodium excretion (FE_{Na^+}) in W group, which were reverted in supplemented animals. Tubular sodium handling was modified in coconut fat supplementation groups, where CF group presented stimulus in Na^+ proximal reabsorption (reduced lithium clearance and RPF_{Na^+} increased), and CFW shown a reduction in Na^+ proximal reabsorption (FE_{Li} increased and RPF_{Na^+} reduced). Fish oil supplementation does not seem to interfere with Na^+ reabsorption in this segment. The analysis of renal tissue histology by light and transmission microscopy was not affected by the presence of tumor or lipid supplementation. In resume, FO supplementation reduced cachexia, with a reduction in tumor growth rate, and had a renoprotector effect, with a rise in renal plasma flow and a preservation of glomerular filtration. Supplementation with CF altered renal homodynamic parameters and tubular sodium handling, and the presence of the tumor changed more significantly these parameters.

Keywords: fish oil, coconut fat, renal function, cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Estrutura química e nomenclatura dos ácidos graxos com 18 carbonos (adaptado de SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008).....	14
FIGURA 2	Biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados (adaptado de SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008).....	15
FIGURA 3	Metabolismo oxidativo do ácido araquidônico e eicosapentaenóico pelo mecanismo da ciclooxigenase e 5-lipoxigenase com a formação de diferentes classes de tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos (adaptado de SIMOPOULOS, 2003).....	17
FIGURA 4	Peso do tumor (g) dos grupos tumor (W) (n=12) e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=11) e gordura de coco (WGC) (n=11). a $p < 0,05$ vs W.....	35
FIGURA 5	Peso do rim (g) normalizado por peso corporal (kg) dos animais dos grupos controle (C) (n=14), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=15), tumor (W) (n=12), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11).	35
FIGURA 6	Concentração de proteínas plasmáticas totais (g/dL) dos grupos controle (C) (n=10), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=10), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=12), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=11) e gordura de coco (WGC) (n=11). a $p < 0,05$ vs C, b $p < 0,05$ vs COP e W e c $p < 0,05$ vs CGC.	36
FIGURA 7	Concentração de proteínas urinárias (mg/dia) dos grupos controle (C) (n=10), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=10), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=12), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=11) e gordura de coco (WGC) (n=11).....	37
FIGURA 8	Filtração glomerular pelo <i>clearance</i> de inulina (mL/min/kg) dos grupos C (n=13), COP (n=13), CGC (n=17), W (n=6), WOP (n=8) e WGC (n=7). a $p < 0,05$ vs CGC e W.	39
FIGURA 9	Fluxo plasmático renal pelo <i>clearance</i> de paraamino-hipúrico (mL/min/kg) dos grupos C (n=12), COP (n=15), CGC (n=19), W (n=6), WOP (n=8) e WGC (n=7). a $p < 0,05$ vs C, b $p < 0,05$ vs W.	40
FIGURA 10	Fluxo urinário (mL/min) dos grupos controle (C) (n=13), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=15), tumor (W) (n=12), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=9).	41
FIGURA 11	Osmolalidade plasmática (mOsm/kgH ₂ O) dos grupos controle (n=12), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco	

	(CGC) (n=13), tumor (W) (n=10), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11). Os valores correspondem à Média ± EP. a p<0.05 vs C e b p<0,05 vs W.....	42
FIGURA 12	Osmolalidade urinária (mOsm/kgH ₂ O) dos grupos controle (n=12), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=10), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11).	43
FIGURA 13	<i>Clearance</i> de H ₂ O livre (mL/min) dos grupos controle (n=12), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=10), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11).....	43
FIGURA 14	<i>Clearance</i> de lítio (mL/min/kg) dos grupos controle (C) (n=12), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=10), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11). a p<0,05 vs C.	45
FIGURA 15	Imagem digitalizada da técnica de microscopia de luz com coloração de Hematoxilina e Eosina de tecido renal com focalização de glomérulo e estruturas tubulares. A – grupo controle (C); B – grupo controle suplementado com óleo de peixe (COP); C – grupo controle suplementado com gordura de coco (CGC); D – grupo portador de tumor (W); E – grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe (WOP); F – grupo portador de tumor suplementado com gordura de coco. Aumentos de 40x e zoom de 2,1x.....	48
FIGURA 16	Eletromicrografia do tecido renal. Identificação de célula tubular, com evidência do núcleo (N), seta maior indicando membrana plasmática intacta e seta menor com evidência de mitocôndria. Análise do grupo controle (C) em aumento de 25000x.....	49
FIGURA 17	Eletromicrografia do tecido renal. Identificação de estruturas glomerulares, seta maior evidencia processos podais e seta menor fenestras de filtração intactos. Análise do grupo controle suplementado com óleo de peixe (COP) em aumento de 40000x.....	50
FIGURA 18	Eletromicrografia do tecido renal. Identificação de estruturas glomerulares, seta maior evidencia processos podais e seta menor, fenestras de filtração intactos. Análise do grupo controle suplementado com gordura de coco (CGC) em aumento de 40000x.	51
FIGURA 19	Eletromicrografia do tecido renal. Identificação de estruturas glomerulares, seta maior evidencia processos podais e seta menor, fenestras de filtração intactos. Análise do grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) em aumento de 40000x.	52

FIGURA 20 Eletromicrografia do tecido renal. Identificação de estruturas glomerulares, seta maior evidencia processos podais e seta menor, fenestras de filtração intactos. Análise do grupo portador de tumor suplementado com gordura de coco (WGC) em aumento de 40000x.....53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição e tempo de coloração de cada solução para microscopia de luz.	32
TABELA 2	Peso (g) antes e depois da inoculação do tumor e a variação do ganho de peso dos grupos C (n=14), COP (n=12), CGC (n=15), W (n=12), WOP (n=11) e WGC (n=11). Os valores correspondem à Média ± EPM. a p<0,05 vs C e b p<0,05 vs W e c p<0,05 vs CGC.....	34
TABELA 3	Concentração plasmática de creatinina e uréia (mg/dL) dos grupos C (n=9), COP (n=9), CGC (n=12), W (n=9), WOP (n=10) e WGC (n=9). Os valores correspondem à Média ± EPM. a p<0,05 vs CGC e W.....	38
TABELA 4	Valores de filtração glomerular (mL/min/kg), fluxo plasmático renal (mL/min/kg) e fração de filtração (%) dos grupos C (n=12), COP (n=15), CGC (n=19), W (n=6), WOP (n=8) e WGC (n=7). a p<0,05 vs C, b p<0,05 vs W e c vs CGC.....	40
TABELA 5	Valores das osmolalidades plasmática e urinária expressas em mOsm/kgH ₂ O e <i>clearance</i> osmolar e de H ₂ O livre expressas em mL/min dos grupos controle (C) (n=12), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=10), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11). Os valores correspondem à Média ± EP. a p<0,05 vs C e b p<0,05 vs W.....	42
TABELA 6	Valores das concentrações plasmáticas de Na ⁺ e K ⁺ (mEq/dL), carga excretada de Na ⁺ e K ⁺ (μEq/min) e fração de excreção (FE) (%) de Na ⁺ nos grupos C (n=11), COP (n=11), CGC (n=12), W (n=10), WOP (n=12) e WGC (n=12). Os valores correspondem à Média ± EPM. a p<0,05 vs W.	44
TABELA 7	Fração de Excreção de Lítio (FE _{Li+}) (%), Reabsorção Proximal Fracional de Na ⁺ (RPF _{Na+}), <i>Distal Delivery</i> de Na ⁺ a (%), e a Reabsorção Pós-Proximal Fracional de Na ⁺ (RPPF _{Na+}) (%) dos grupos controle (C) (n=7), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=7), com gordura de coco (CGC) (n=9), tumor (W) (n=7), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=5) e gordura de coco (WGC) (n=4). a p<0,05 vs C, b p<0,05 vs CGC e c p<0,0001 vs CGC.....	46
TABELA 8	Perfil de ácidos graxos (g/100g de ácidos graxos totais), obtido por HPLC (<i>High performance liquid chromatography</i>) das cápsulas de óleo de peixe, gordura de coco e da ração administrada aos animais. Os valores correspondem à Média ± EPM.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
AA	Ácido araquidônico
ADH	Hormônio antidiurético
AG	Ácido graxo
AGCM	Ácido graxo de cadeia média
AGL	Ácido graxo livre
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AL	Ácido linoléico
ALA	Ácido α -linolênico
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
C	Grupo controle
C_{Cr}	<i>Clearance</i> de creatinina
C_{in}	<i>Clearance</i> de inulina
C_{H_2O}	<i>Clearance</i> de água livre
C_{Li}	<i>Clearance</i> de lítio
C_{Na}	<i>Clearance</i> de sódio
C_{osm}	<i>Clearance</i> osmolar
CEEA	Comitê de ética em experimentação animal
CF	<i>Coconut fat</i>
CGC	Grupo controle suplementado com gordura de coco
COP	Grupo controle suplementado com óleo de peixe
COX	Ciclooxigenase
DD_{Na^+}	<i>Distal delivery</i> de sódio
DHA	Ácido docosahexaenóico
DPA	Ácido docosapentaenóico
EP	Receptor prostanóides E
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ERO	Espécie reativa de oxigênio

FE	Fração de excreção
FE _{K+}	Frações de excreção de potássio
FE _{Li+}	Frações de excreção de lítio
FE _{Na+}	Frações de excreção de sódio
FTG	<i>Feedback</i> tubuloglomerular
FO	<i>Fish oil</i>
HETE	Ácido hidroxi-eicosatetraenóico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
LMF	Fator de mobilização de lipídeos
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno
M _a	Peso do animal (kg)
MD	Mácula densa
MAC16	Adenocarcinoma de cólon induzido por metilhidrazida, 16ª linha de células
n-3	Ácido graxo ômega 3
n-6	Ácido graxo ômega 6
n-9	Ácido graxo ômega 9
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OP	Óleo de peixe
PAH	Ácido para-amino-hipúrico
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
P _{cr}	Concentração plasmática de creatinina (mg/dL)
PIF	Fator de indução de proteólise
P _{In}	Concentração plasmática de inulina
P _{ion}	Concentração plasmática de Na ⁺ ou K ⁺ (mEq/L)
P _{Li}	Concentração plasmática lítio (mEq/L)
P _{osm}	Osmolalidade plasmática (mOsm/L)

P_{PAH}	Concentração plasmática de paraamino-hipúrico
PREVEND	<i>The Prevention of Renal and Vascular End-Stage Disease</i>
RPF_{Na^+}	Reabsorção proximal fracional de sódio
$RPPF_{Na^+}$	Reabsorção pós-proximal fracional de sódio
TAG	Triacilglicerol
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano
U_{cr}	Concentração urinária creatinina (mg/dL)
U_{In}	Concentração urinária de inulina
U_{ion}	Concentração urinária de Na^+ ou K^+ (mEq/L)
U_{osm}	Osmolalidade da urina (mOsm/L)
U_{PAH}	Concentração urinária de paraamino-hipúrico
VEC	Volume extracelular
VFG	Velocidade de filtração glomerular
V_u	Volume urinário por minuto (mL/min)
ZAG	Glicoproteína- α_2 ligada ao zinco
W	Grupo portador de tumor de Walker
WGC	Grupo portador de tumor de Walker suplementado com gordura de coco
WOP	Grupo portador de tumor de Walker suplementado com óleo de peixe

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ÁCIDOS GRAXOS.....	13
1.2 CÂNCER	20
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 ANIMAIS.....	26
4.2 INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS DE WALKER 256	26
4.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	27
4.4 AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA RENAL.....	31
5 RESULTADOS	34
5.1 GANHO DE PESO DOS ANIMAIS, PESO TUMORAL E PESO DO RIM.....	34
5.2 PARÂMETROS PLASMÁTICOS E URINÁRIOS	36
5.3 PARÂMETROS DA HEMODINÂMICA RENAL.....	38
5.4 OSMOLALIDADE PLASMÁTICA E URINÁRIA E CLEARANCE DE H ₂ O LIVRE E OSMOLAR.....	41
5.5 ELETRÓLITOS	44
5.6 AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA RENAL.....	47
6 DISCUSSÃO	54
6.1 ÁCIDOS GRAXOS E FUNÇÃO RENAL	58
REFERÊNCIAS	70
ANEXO	77

1 INTRODUÇÃO

Durante os últimos dez mil anos aconteceram alterações significativas na dieta dos seres humanos, em particular no tipo e na quantidade de ácidos graxos consumidos. A partir da revolução industrial houve um incremento significativo na ingestão de gorduras, atingindo 40% do valor calórico total, com predomínio de ácidos graxos saturados e do tipo *trans*, e desproporção na ingestão de ácidos graxos essenciais (SIMOPOULOS, 1999a).

Associado a essas alterações na dieta foi observado um aumento na prevalência das doenças crônico-degenerativas tais como diabetes, hipertensão arterial, arteriosclerose, obesidade e câncer. Em adição à dieta, também ocorreram alterações no hábito de vida das pessoas, por exemplo: aumento do sedentarismo, e a exposição crônica a substâncias nocivas (tabaco, poluentes, etc.). Estes fatores interagem com processos bioquímicos, que são controlados geneticamente, levando a formação das doenças crônicas (LEONARD, 2002).

1.1 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos caracterizados por apresentar longa cadeia de hidrocarbonetos com um grupo carboxila numa extremidade e um metila na outra extremidade (CALDER, 2005; SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008). Podem ser divididos em saturados ou insaturados, dependendo do grau de saturação da molécula. A ausência de duplas ligações é classificada como saturados e na presença de duplas ligações, insaturados (RUXTON *et al.*, 2004). Os ácidos graxos mais comuns e os adquiridos pela dieta são principalmente na forma de triacilgliceróis (TAG), compostos de três cadeias de ácidos graxos ligados em uma molécula de glicerol, e são armazenados para reserva energética, transformados em hormônios, transportadores, mensageiros celulares e constituintes da membrana celular (ALBERTS *et al.*, 2004).

Os lipídeos incluem tri-, di- e monoacilgliceróis, esfingolipídeos, classificados por ligações com outras moléculas, ácidos graxos livres (AGL), colesterol, fitoesteróis, de

acordo com sua origem, pigmentos e vitaminas lipossolúveis (FRITSCHÉ, 2006).

Existem três importantes famílias de ácidos graxos insaturados (AGPI): ômega 3 (n-3 ou ω -3), ômega 6 (n-6 ou ω -6) e ômega 9 (n-9 ou ω -9), sendo que esta nomenclatura se refere à posição da primeira dupla ligação a partir do terminal metila, carbono denominado ômega da cadeia de hidrocarboneto. Nomenclatura e exemplificação de estrutura química dos ácidos graxos de 18 carbonos, AG saturado como o ácido esteárico, monoinsaturado como o ácido oléico e poliinsaturados, ácido linoléico e α -linolênico, são apresentados na FIGURA 1 (CALDER, 2006; SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008).

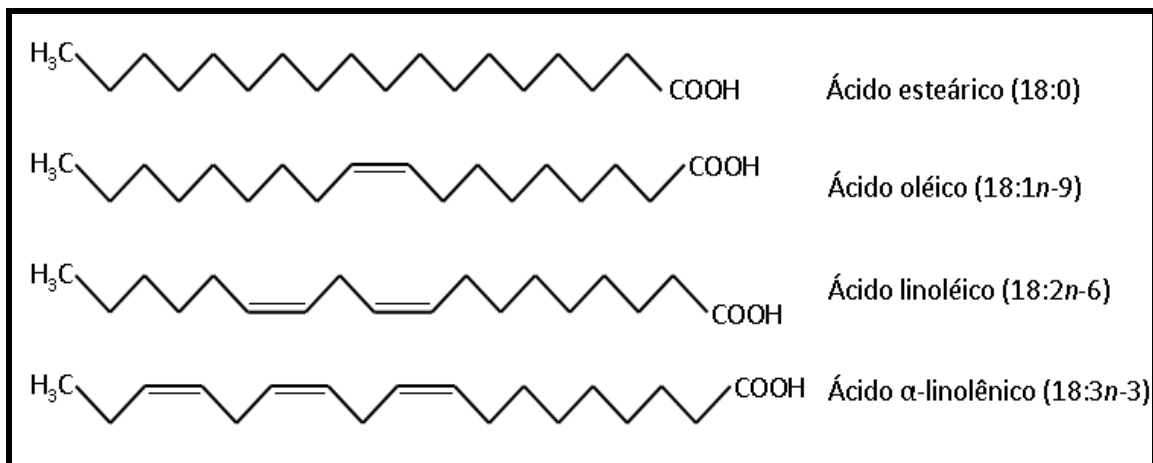


FIGURA 1 Estrutura química e nomenclatura dos ácidos graxos com 18 carbonos (adaptado de SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008).

A biossíntese dos ácidos graxos n-3 e n-6, representada esquematicamente pela FIGURA 2, compartilham a mesma enzima desaturase (Δ 6-desaturase), e, portanto competem pela mesma via metabólica. A Δ 6-desaturase prioriza o ácido α -linolênico, mas em altas concentrações de ácido linoléico podem inibir a conversão do ALA em EPA e DHA, reduzindo a quantidade destes ácidos graxos (CALDER, 2001; RUXTON *et al.*, 2004).

O ácido graxo α -linolênico (ALA; 18:3 n-3) é precursor do ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5 n-3), docosapentaenóico (DPA; 22:5 n-3) e do docosahexaenóico (DHA; 22:6 n-3) e o ácido linoléico (AL; 18:2 n-6) é precursor do ácido araquidônico (AA; 20:4 n-6). Os ALA e AL possuem alguns efeitos opostos sobre

vasodilatação, perfil lipídico, entre outros, e são considerados essenciais para a dieta humana, pois não podem ser sintetizados e interconvertidos pelo organismo humano (CALDER, 2001; TAPIERO *et al.*, 2002; RUXTON *et al.*, 2004; SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008).

O AL é encontrado em quantidades significantes em diversos óleos vegetais, como o de milho e soja, e seus derivados, como margarinas. O ALA está presente em vegetais de folhas verdes escuras e em alguns óleos vegetais, como o de linhaça. Os dois juntos contribuem com 95 a 98% dos AGPI na dieta de países ocidentais. A ingestão de AL, nestes países, aumentou drasticamente desde a década de 1970 com a introdução de óleos e margarinas no preparo dos alimentos. Já o consumo de ALA não foi modificado expressivamente durante o tempo. Entretanto, a razão n-6:n-3, pelo aumento do consumo de n-6, apresentou grande aumento. A razão recomendada é de 4:1 sendo que em populações ocidentais podem ser observadas razões de 5, 20 e até 40:1 dependendo da região (SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008).

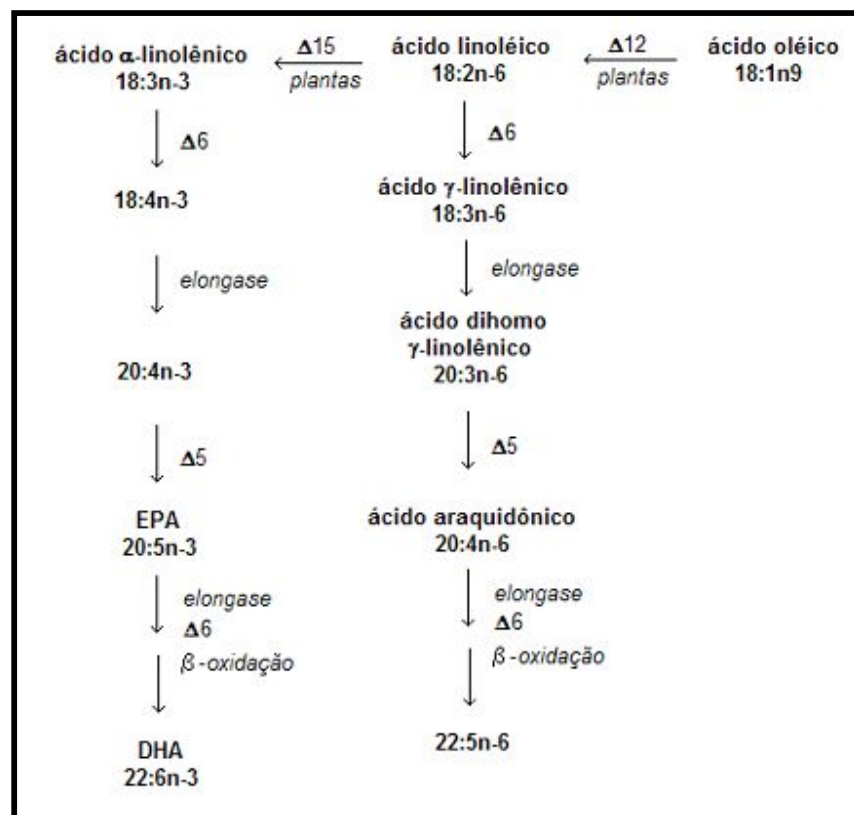


FIGURA 2 Biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados (adaptado de SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008).

O ácido araquidônico, derivado do ácido linoléico, é encontrado nas carnes e vísceras e a ingestão estimada é de 50 a 500mg/dia. Já os derivados do ácido linolênico, o EPA, DPA e DHA estão presentes nos peixes, especialmente nos peixes mais gordurosos, como tuna, salmão, sardinha e carapau, e também, nos vegetais de folhas verdes escuras. A porção de um destes peixes pode prover entre 1,5 a 3,5g destes AGPI n-3. O óleo de peixe (OP) disponível comercialmente apresenta esse AG numa proporção de cerca 30% do total de lipídeos, de forma que uma cápsula contendo 1g de OP normalmente provém aproximadamente 300mg dos AGPI n-3 (SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008).

Os AGPIs são importantes constituintes das células, onde assumem papéis de assegurar funções adequadas de proteínas de membrana, mantém a fluidez da membrana plasmática e regulam a sinalização celular, ativação de fatores de transcrição, expressão gênica e função celular (SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008).

O efeito de síntese de eicosanóides, prostaglandinas e leucotrienos traz ao ômega-3, propriedades antiinflamatórias, antitrombóticas, antiarrítmicas e vasodilatadoras, enquanto que os produtos derivados do ácido araquidônico (AA) possuem efeitos opostos, como promotores de inflamação, vasoconstrição, febre, eritema, formação de trombos, migração e proliferação celular (SIMOPOULOS, 1999a; LOMBARDO; CHICCO, 2006).

1.1.1 AGPIs n-3 e n-6

Ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3) apresentam efeitos em diversos processos fisiológicos na saúde e nas doenças, participam na regulação plasmática de concentrações de lipídeos, na ação insulínica, no desenvolvimento neural e na função visual, e diminuem o risco de doenças cardiovasculares, autoimunes e doenças malignas (JUMP, 2002; RUXTON *et al.*, 2004; BHATTACHARYA *et al.*, 2007).

Uma dieta rica em OP contendo alto teor de ácidos graxos n-3, como EPA e DHA, apresenta significantes propriedades antiinflamatórias através da inibição de eicosanóides pró-inflamatórios derivados dos ácidos graxos n-6, como os derivados do

AA, e a diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Os ácidos graxos n-3 competem com os ácidos graxos n-6 na incorporação de membranas celulares pela ação da ciclooxigenase (COX) e da 5-lipoxigenase (5-LOX). Assim, a produção de eicosanóides pró-inflamatórios, como a prostaglandina (PG) E₂, leucotrienos (LT) B₄ e tromboxano (TX) B₂ é significativamente diminuída, com consequente produção das classes 3 de PG e TX e da classe 5 dos LT, pelos ácidos graxos n-3. Metabolismo exemplificado pela FIGURA 3 (CALDER, 2001; CALDER, 2006; LOMBARDO; CHICCO, 2006; BHATTACHARYA *et al.*, 2007; CALDER, 2007).

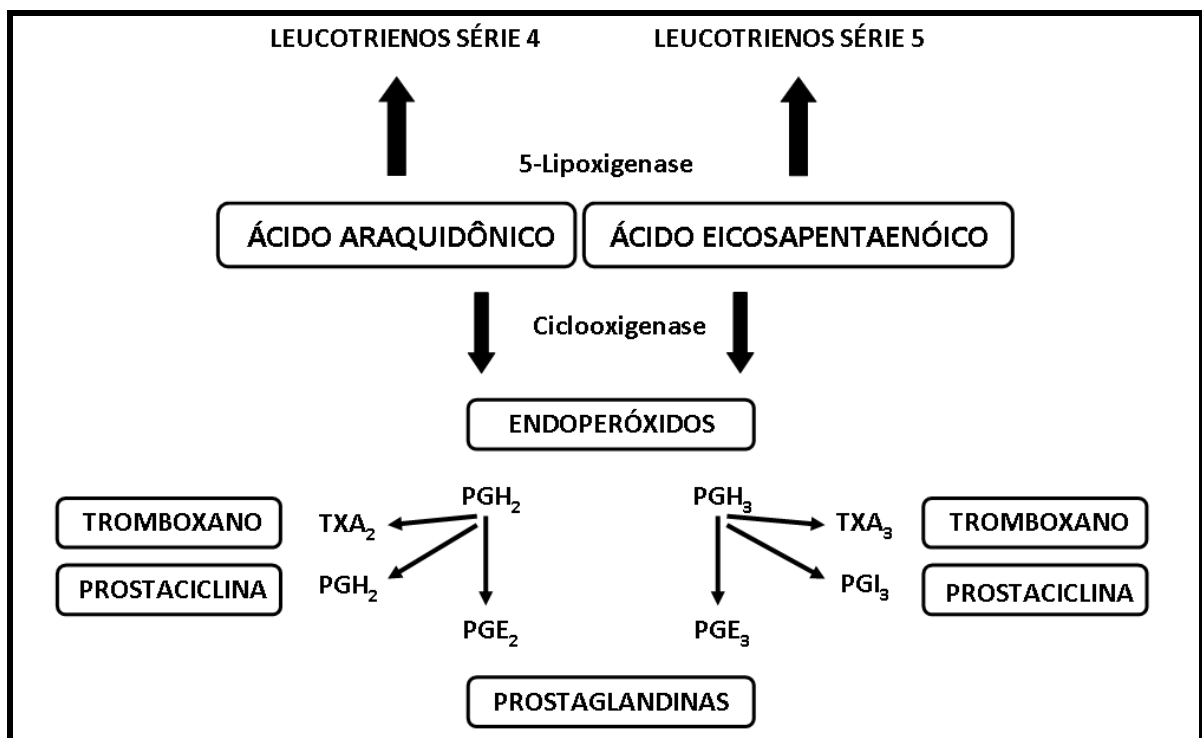


FIGURA 3 Metabolismo oxidativo do ácido araquidônico e eicosapentaenóico pelo mecanismo da ciclooxigenase e 5-lipoxigenase com a formação de diferentes classes de tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos (adaptado de SIMOPOULOS, 2003).

Devido ao aumento no consumo de ácidos graxos n-6 na dieta ocidental, os eicosanóides produzidos a partir do AA são formados em maior quantidade do que a partir dos AGPIs n-3, principalmente do EPA. Portanto, dieta rica em AGPIs n-6 leva a um estado fisiopatológico pró-trombótico e pró-agregador, com aumento na viscosidade sanguínea, vasoespasmos, vasoconstrição, além de promover o câncer. Em contraste, AGPIs n-3 parecem evitar o câncer por influenciarem na atividade de enzimas e

proteínas relacionadas à sinalização intracelular e proliferação celular (JIANG, 1998; SIMOPOULOS 1999a; SIMOPOULOS, 1999b; ROSE, 1999; ARONSON, 2001; CALDER, 2001).

1.1.2 Papel dos AGPI e de seus produtos na função renal

No caso do rim, o sistema enzimático da ciclooxygenase é a via mais importante de metabolização do AA. O principal papel fisiológico dos produtos derivados do metabolismo do AA no rim, é a modulação da ação de outros autacóides e hormônios, particularmente em relação à ação destas substâncias no tônus vascular, na função glomerular e no manejo tubular de água e eletrólitos. Os produtos derivados da ação da ciclooxygenase sobre o AA estão relacionados com mudanças observadas na função renal em várias patologias, tais como dano glomerular, várias formas de insuficiência renal aguda e/ou crônica, nefrotoxicidade por ciclosporina, síndrome hepatorenal, nefropatia diabética e por IgA e hipertensão essencial (MATTIX; BADR, 2001; HAO; BREYER, 2008).

Entretanto, a utilização de dietas ricas em AGPIs n-3 determina uma competição destes substratos com as vias metabólicas do AA, resultando na formação de produtos finais biologicamente inativos ou pouco potentes. Conseqüentemente, a suplementação com AGPIs tem sido utilizada para alterar a evolução das patologias renais nas quais os derivados do AA estão envolvidos. Na maioria destas patologias a evolução da doença foi significativamente reduzida pela utilização de um suplemento dietético rico em óleo de peixe (VASKONEN, 1996; BAYORH, 1996; BROWN, 2000; DONADIO, 2001; HAO; BREYER, 2008).

O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é associado com os produtos do metabolismo do ácido araquidônico. Esses eicosanóides têm importante papel na regulação na hemodinâmica renal e filtração glomerular. Prostaglandina E₂, sintetizada pelas estruturas vasculares e renais, aumenta o fluxo renal e a taxa de filtração glomerular, além de promover a inflamação, como já citado (DOLEGOWSKA *et al.*, 2006).

Outras classes da lipoxigenase estão envolvidas na produção de metabólitos relacionados com células do sistema imunitário e em alguns tecidos provocando inflamação e dano celular. 12- e 15-LOX catalisam a síntese de 12- e 15-ácido hidroieicosatetraenóico (HETEs), respectivamente, nos glomérulos, células mesangiais, túbulos corticais e vasos renais, onde afetam a hemodinâmica renal e a taxa de filtração glomerular. 12- e 15-HETE são relacionados com a resposta inflamatória e, especificamente, o 12-HETE inibe a redução do fluxo sanguíneo renal estimulado pela angiotensina II (DOLEGOWSKA *et al.*, 2006).

Metabólitos da LOX apresentam importante papel no desenvolvimento da glomerulonefrite e outras desordens inflamatórias renais. Em condições normais, o tromboxano A₂, metabólito da ciclooxigenase, é produzido em pequenas quantidades no rim, tendo como principal local de síntese as células mesangiais e os podócitos nos glomérulos (DOLEGOWSKA *et al.*, 2006).

O efeito da suplementação com AGPIs n-3 em indivíduos normais tem sido muito menos estudada. DUSING *et al.* (1990) investigaram o efeito das prostaglandinas na função e no metabolismo renal, através da suplementação durante seis semanas com 6g/dia de AGPIs n-3, em 10 voluntários normais. Estes indivíduos apresentaram incremento significativo do fluxo plasmático renal e diminuição na resistência vascular renal. Estas mudanças determinaram incremento significativo na filtração glomerular, que passou de 97±3 mL/min antes da suplementação para 107±3 mL/min após esta, e redução na fração de filtração. VALENTE GAMBA e colaboradores (2001) reportaram que a suplementação da dieta em ratos adultos com 5% de óleo de peixe acelerava o progressivo declínio da filtração glomerular e no fluxo plasmático renal habitualmente observado no envelhecimento. Por outro lado, este tratamento incrementou a excreção resultante de ácido nos animais com 9 a 18 meses de idade. Uma deterioração da função renal, proteinúria e queda da filtração glomerular foram reportadas também por LOGAN *et al.* (1992) após uma suplementação por 6 meses com óleo de peixe. Em estudo recente encontramos que a suplementação crônica (por uma geração) com óleo de peixe incrementou a filtração glomerular, entretanto sem ser estatisticamente significativa (FERNANDEZ *et al.*, 2004). As alterações hemodinâmicas na circulação renal não foram estudadas neste trabalho.

1.2 CÂNCER

Câncer é apresentado como a maior causa de mortalidade nos países desenvolvidos e sua incidência vem aumentando em países em desenvolvimento. Alguns tipos de cânceres ocorrem em jovens, mas a maioria deles está associada ao envelhecimento, juntamente com eventos de acumulação de danos celulares genéticos e epigenéticos, com geração multifatorial (hábitos de vida irregulares, alimentação, sedentarismo, tabagismo, entre outros). Ciclo celular descontrolado, aumento da estimulação dos oncogenes e inibição dos genes supressores de tumor são considerados fatores primordiais para iniciação da tumorigênese. Entretanto, outros fatores como o próprio microambiente do tumor, como a hipóxia, é fundamental para sua progressão, aumento da resistência e metástase (CALDER, 2006; BRAHIMI-HORN *et al.*, 2007).

Pacientes com câncer frequentemente exibem a síndrome da caquexia (do grego *kakos* = ruim, mal; *hexis* = condição), sendo a maior causa de morbi-mortalidade em pacientes em câncer avançado. Esta síndrome é um problema metabólico associado a diversas manifestações tais como: perda de peso, depleção severa da musculatura esquelética e do tecido adiposo, alterações nos níveis séricos de lipídeos e glicose, paladar, saciedade precoce, anemia, edema, aumento do gasto energético, aumento na síntese de proteínas hepáticas de fase aguda, com consequência de menor tempo de sobrevivência e piora na qualidade de vida dos pacientes, sendo que essas características que diferenciam a caquexia da desnutrição. Caquexia está relacionada não somente ao câncer, mas também a outras doenças infecciosas, parasitárias, auto-imunes e crônicas (TISDALE, 2004; FEARON *et al.*, 2006; LUFT, 2007).

Tem sido sugerido que a caquexia é mediada certamente por citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas IL-1, IL-2 e IL-6, interferon- γ (IFN- γ). Estas citocinas são produzidas por alguns tecidos e pelas células tumorais, podem atravessar a barreira hematoencefálica atuando como agentes supressores de apetite. Mediadores catabólicos de lipólise e proteólise, como o fator de mobilização de lipídeos (LMF) e fator de indução de proteólise (PIF) são originalmente produzidos somente pelo tumor, entretanto, achados recentes demonstram que o LMF pode ser adicionalmente

produzido no tecido adiposo marrom e branco. Hormônios também têm sido arrolados como colaboradores no desenvolvimento e estabelecimento do quadro caquético. Cortisol, glucagon e adrenalina (hormônios catabólicos) são encontrados em concentrações elevadas enquanto as de insulina (hormônio anabólico) estão diminuídas, o que favorece o quadro de resistência periférica à insulina, tanto em modelos animais quanto em estudos em humanos (DUNLOP; CAMPBELL, 2000; TISDALE, 2001; BARBER, 2001; TISDALE, 2004; LUFT, 2007).

Algumas anormalidades neuroendócrinas e no balanço de água e sal são observadas em pacientes caquéticos portadores de tumor. O aumento na atividade serotoninérgica no sistema nervoso central como resultado do aumento da disponibilidade do seu precursor triptofano, tem sido utilizado como hipótese para desencadear o início da síndrome da caquexia (GIACOSA *et al.*, 1996). KITCHENER e DOURISH (1994) sugeriram que a ativação dos receptores de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT) 5HT_{-1B} e 5HT_{-1C} podem estar associados à indução no aumento da saciedade em ratos e que o receptor 5HT₂ reduz a sensação de fome. O bloqueio do receptor 5HT₃ também parece melhorar a sensação de fome em pacientes portadores de câncer (EDELMAN, 1999). Outros fatores neurológicos e neuropsiquiátricos também se manifestam nesta síndrome como dor, depressão, ansiedade, saciedade precoce e aversão a alimentos e aromas (PLATA-SALAMÁN, 2000). Por outro lado, transtornos na excreção renal de água e sal são observados frequentemente em indivíduos caquéticos portadores de tumor, tanto em humanos como em diversos modelos animais (incluindo ratos portadores do tumor de Walker 256) (BLACKBURN, 1977; RETTORI, 2000; FERNANDEZ *et al.*, 2004). Em associação com estas alterações no metabolismo hidroeletrólítico, várias formas de carcinoma apresentam patologias glomerulares que se manifestam principalmente por proteinúria intensa e falha renal progressiva (USALAN; EMRY, 1998).

A depleção das proteínas musculares na caquexia apresenta como fator principal o mecanismo do complexo protéico ubiquitina-proteossoma, onde proteínas para degradação são marcadas por poliubiquitinação e assim, clivadas no proteossoma 26S, uma estrutura cilíndrica com enzimas proteolíticas. O aumento da estimulação deste sistema no músculo esquelético na caquexia é induzido por metabólitos produzidos pelo

tumor. O PIF é um destes produtos estimuladores do sistema ubiquitina-proteossoma e, portanto, é foco para intervenções no tratamento do câncer. O ácido eicosapentaenóico é considerado antagonista da ação do PIF (TISDALE, 2004; FEARON *et al.*, 2006).

WHITEHOUSE *et al.* (2001) demonstraram que em camundongos caquéticos por tumor MAC16 (adenocarcinoma de cólon induzido por metilhidrazida, 16ª linha de células), o EPA atenuou a degradação protéica pela inibição do aumento da expressão de subunidades do proteossoma e de enzimas ubiquitina-conjugadas. O EPA não afeta a síntese protéica, mas tem sua ação antagônica ao PIF pela sinalização intracelular, onde sugere prevenir a acumulação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B).

1.2.1 AGPIs e câncer

KARMALI *et al.* (1996) mostrou que os ácidos graxos poliinsaturados apresentavam efeitos sob o crescimento tumoral em diferentes modelos experimentais de tumor, onde os eicosanóides derivados dos ácidos AGPIs n-6 promoviam efeito maior na carcinogênese, proliferação e diferenciação celular, metástases, e caquexia do que os AGPIs n-3. YANG (1999) demonstrou a relação entre o consumo de gorduras e o desenvolvimento de doenças prostáticas, como o câncer de próstata. Os pacientes portadores deste câncer apresentavam maiores concentrações de AGPIs n-6, menores de AGPIs n-3 e maior razão n-6/n-3 do que os indivíduos não-portadores de adenoma.

TERRY *et al.* (2001), em estudo epidemiológico de 30 anos, mostraram que homens com baixo consumo de peixes, fonte de AGPIs n-3, apresentavam risco três vezes maior de desenvolver câncer de próstata. Isto sugere que os AGPIs n-6 estariam envolvidos com efeitos promotores, enquanto os AGPIs n-3 com efeitos antipromotores na proliferação celular no câncer. Alguns autores mostram que os AGPIs n-3 estariam envolvidos na produção e no efeito biológico das citocinas (MEYDANI, 1996; ALEXANDER 1998; De PABLO, 2000).

Alguns estudos mostraram que doses diárias entre 2 a 6 g de AGPIs n-3 apresentam efeitos antiinflamatórios por reduzirem a produção de citocinas pró-inflamatórias em voluntários saudáveis e em pacientes portadores de câncer de

pâncreas. Esses efeitos podem estar associados a uma alteração no balanço da síntese de eicosanóides com ação inflamatória menor e com componentes menos agregadores, provenientes dos AGPIs n-3, do que àqueles produzidos pelos AGPIs n-6 (CALDER, 2006; BARBER, 2001).

Em resumo, os danos causados pela caquexia são devidos às alterações metabólicas presentes nesta síndrome. A suplementação com óleo de peixe afeta alguns dos mediadores envolvidos nessas alterações metabólicas, já que os AGPIs n-3 modulam a síntese de citocinas, reduzem a síntese de mediadores pró-inflamatórios como as PGE₂, e aumentam a taxa de peroxidação lipídica (BABA *et al.*, 2000; TISDALE, 2004; FEARON *et al.*, 2006; LUFT, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

Ao longo dos anos, modificações na dieta geraram o aumento de doenças crônico-degenerativas, sendo que essas mudanças se devem principalmente pelo aumento do consumo de gorduras saturadas. O câncer é uma dessas doenças, onde sua incidência está em crescente aumento. Uma das maiores preocupações no câncer é a síndrome da caquexia, responsável pela maior causa de morbi-mortalidade dos indivíduos, sendo causada por fatores hormonais, humorais e produtos gerados pelo próprio tumor.

FERNANDEZ e colaboradores (2004) demonstraram que a suplementação por uma geração com óleo de peixe, um ácido graxo poliinsaturado (AGPI), rico em ômega 3, é capaz de diminuir a taxa de crescimento tumoral, o grau de caquexia em indivíduos com câncer, alterar a resposta imunitária e melhorar a função renal e o balanço hidroeletrólítico em animais caquéticos. Entretanto, os mecanismos responsáveis pelas alterações na função renal observados nos animais suplementados não têm sido estudados até o presente momento.

O efeito da suplementação com AGPIs n-3 na função renal de indivíduos normais tem sido muito menos estudada, e os resultados obtidos em muitos casos são contraditórios.

Uma vez que caquexia é altamente debilitante e leva a alteração da funcionalidade do sistema renal e que a suplementação com ácidos graxos n-3 tem sido utilizada no tratamento de diversas patologias crônicas (incluindo o câncer), é imperativo o estudo do efeito da suplementação com ácido graxo n-3 sobre a função renal de ratos controles e portadores de tumor.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste projeto foi estudar os mecanismos hemodinâmicos responsáveis pelas alterações na função renal observadas em animais suplementados de forma crônica com ácidos graxos ômega-3 (óleo de peixe) e seu possível efeito renoprotetor, em ratos Wistar controle ou portadores do tumor de Walker 256.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o ganho de peso dos animais, peso tumoral e peso do rim;
- Avaliar a função glomerular e hemodinâmica renal pelo *clearance* de inulina e ácido paraamino-hipúrico (PAH), respectivamente;
- Verificar os aspectos gerais da função renal por:
 - dosagens plasmáticas de creatinina e uréia e, plasmáticas e urinárias de proteína, osmolalidade e eletrólitos (Na^+ e K^+);
 - *clearance* de lítio
- Avaliar a histologia renal por microscopia de luz e eletrônica de transmissão;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Paraná – CEEA nº 243 (ANEXO).

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos albinos da linhagem Wistar com aproximadamente 21 dias de vida, recém-desmamados obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ com ração composta em macronutrientes de 63,4% de carboidratos, 25,6% de proteínas e 11% de lipídeos (NUVILAB CR1[®], Nuvital Nutrientes Ltda) e água à vontade (*ad libitum*). Estes animais foram divididos em três grupos, o primeiro dieta suplementada todos os dias por via oral (técnica de gavagem) com 1g/kg de peso corporal (p.c.), de óleo de peixe (n-3) (grupo OP). Sendo que o OP é obtido de uma preparação de lipídeos marinhos, gentilmente doado pela Fundação Herbarium, o qual contém em 1g/cápsula na proporção de 0,192 g de EPA e 0,124g DHA. Um segundo grupo foi suplementado via oral com gordura de coco (ácido graxo saturado), comprada no Mercado Municipal da cidade de Curitiba - PR, na mesma proporção (grupo GC); e um terceiro grupo recebeu a dieta habitual sem suplementação (grupo C, controle). As suplementações tiveram duração de 70 dias.

4.2 INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS DE WALKER 256

Ao atingirem 90 dias de idade e 70 dias de suplementação cada um dos grupos anteriores foi dividido em dois, onde a metade recebeu inoculação da suspensão de células do tumor de Walker 256 (3×10^7 células/mL) (grupos W, WOP, e WGC), e a outra metade dos animais inoculou-se solução salina 0,9% (grupos C, OP, e GC)

(FERNANDES, 1991). Esse carcinosarcoma induz a caquexia em aproximadamente 14 dias após a inoculação da suspensão com células tumorais. Cada grupo de animais ficou com aproximadamente 25 indivíduos.

A partir do dia 11 os animais foram colocados durante 72h em gaiolas metabólicas para permitir a monitorização da ingestão de alimento, água, curva de ganho de peso, diurese e coletas de amostras de urina e sangue para análise.

4.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

4.3.1 Dosagens de concentração de proteína, creatinina e uréia

A determinação da concentração de proteínas totais no sangue e na urina foi realizada pela técnica de Biureto (HENRY, 1974), com kit comercial (Labtest[®]), sendo que os íons cobre em meio alcalino, do reagente de Biureto, reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando a cor púrpura, com leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific[®]) a 545nm, dados expressos em g/dL para a proteinemia e mg/dia para a protenúria.

A concentração de uréia foi dosada utilizando um método colorimétrico enzimático, kit comercial (Labtest[®]), instruções conforme fabricante, onde a uréia é hidrolisada pela urease à íons amônio. Estes na presença de pH alcalino com salicinato e hipoclorito de sódio, sob ação catalisadora do nitroprussiato de sódio forma azul de indofenol, lido a absorbância de 600nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific[®]), sendo a intensidade da cor formada, proporcional a quantidade de uréia da amostra (BERGMEYER, 1985), dados expressos em mg/dL.

Para a dosagem de creatinina plasmática foi utilizado o método de Jaffe modificado, com kit comercial (Labtest[®]). Este método se baseia no princípio de que a creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente (HENRY, 1974). Após, há a adição de acidificante que promove a decomposição de

picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromógenos tendo a diferença das duas medições o valor da creatinina verdadeira, resultado expresso em mg/dL.

4.3.2 Determinação da filtração glomerular e do fluxo plasmático renal

4.3.2.1 *Clearance* de inulina e ácido paraamino-hipúrico (PAH)

A filtração glomerular foi avaliada pelo *clearance* de Inulina, e o fluxo plasmático renal utilizando o *clearance* de PAH (ácido paraamino-hipúrico). Para esta finalidade os ratos foram anestesiados com Thiambutal[®] (50mg/kg peso corporal) por via intraperitoneal (ip.) e colocados sobre uma mesa termostatizada a 37°C. Posteriormente, realizou-se traqueostomia para assegurar a via aérea permeável e procedeu-se a canulação da veia jugular e da artéria carótida esquerdas, para infusão e retirada de amostras sanguíneas, respectivamente. Em seguida, a parede abdominal foi aberta na linha média e a bexiga exposta e canulada a fim de coletar a urina utilizando frascos previamente pesados, sendo o volume urinário determinado gravimetricamente (FERNANDEZ; MALNIC, 1995). Os ratos foram infundidos durante o experimento com uma solução salina isotônica adicionada com manitol a 3% a uma velocidade de 0,1mL/min mediante uma bomba de perfusão contínua. Após a preparação do animal, foi administrada por via intravenosa (iv) a dose *prime* de inulina e PAH [30mg/100g p.c. de inulina e 0,02mg de PAH para cada 1mL de volume extracelular (VEC), sendo considerado VEC como 20% do p.c.] e, após, iniciando-se a infusão da dose de manutenção dessas substâncias. Depois de 30 minutos de espera para a estabilização das concentrações plasmáticas de inulina e PAH, foram realizados dois ou três períodos experimentais de coleta de amostras de sangue e urina em intervalos de aproximadamente 30 minutos. Nas amostras de sangue e urina foram realizadas as dosagens da concentração plasmática (P_{in}) e urinária (U_{in}) de inulina utilizando o reagente de antrona numa modificação do método de Fuehr (FUEHR *et al.*, 1955) e

concentração plasmática (P_{PAH}) e urinária (U_{PAH}) de PAH, usando uma modificação do método de Smith (SMITH *et al.*, 1945).

4.3.3 Dosagem da osmolalidade e eletrólitos

Amostras de sangue arterial retiradas por punção cardíaca foram utilizadas para determinação da concentração plasmática de Na^+ , K^+ e Li por fotometria de chama (CELM FC180) e osmolalidade pelo método de pressão de vapor (MicroOsmômetro – Vapro5520[®] – Vapor Pressure Osmometer, WESCOR-USA).

Com as concentrações plasmáticas e urinárias de sódio, potássio e lítio foram determinadas as Frações de Excreção de Na^+ , K^+ e Li (FE_{Na^+} , FE_{K^+} e FE_{Li}), estes parâmetros servem para avaliar o manuseio renal de íons, o cálculo utiliza as seguintes fórmulas:

$$FE_{ion} = U_{ion} \times V_u / P_{ion} / C_{cr} \quad (\%)$$

Onde:

U_{ion} = Concentração urinária de Na^+ ou K^+ ou Li (mEq/L);

C_{Cr} = *Clearance* de creatinina (mL/min);

P_{ion} = Concentração plasmática de Na^+ ou K^+ ou Li (mEq/L);

V_u = Volume urinário por minuto (mL/min)

Os valores das osmolalidades foram utilizados para determinar o *Clearance* Osmolar (C_{osm}) e o *Clearance* de água livre (C_{H_2O}), de acordo as seguintes fórmulas:

$$C_{osm} = (U_{osm} \times V_u / P_{osm}) \quad (mL/min)$$

$$C_{H_2O} = C_{osm} - V_u \quad (mL/min)$$

Onde:

U_{osm} = Osmolalidade urinária (mOsm/L);

V_u = Volume urinário por minuto (mL/min);

P_{osm} = Osmolalidade plasmática (mOsm/L);

M_a = Peso do animal (kg).

4.3.4 Clearance de lítio

A fim de estudar o manejo tubular do Na^+ se realizou um *clearance* de lítio (C_{Li}). Esta medida pode ser utilizada como marcador da reabsorção de Na^+ pelo túbulo proximal em animais submetidos a uma dieta com valores normais de ingestão de sódio e potássio (THOMSEN; SHIRLEY, 1997). O protocolo foi desenvolvido com a administração por gavagem de 60mM LiCl/100g peso corporal, 14 horas antes do início dos experimentos. Os animais permaneceram em gaiolas individuais, em jejum alimentar e com livre acesso a água. No final do período foi obtida uma amostra de sangue por punção cardíaca.

O *Clearance* de Lítio foi determinado utilizando a seguinte fórmula:

$$C_{\text{Li}} = (U_{\text{Li}} \times V_u / P_{\text{Li}}) / M_a \quad (\text{mL/min})$$

Onde:

U_{Li} = Concentração urinária de lítio (mEq/L);

V_u = Volume urinário por minuto (mL/min);

P_{Li} = Concentração plasmática lítio (mEq/L);

M_a = Peso do animal (kg).

A partir dos valores de *Clearance* de Lítio e as concentrações plasmáticas de Na^+ é possível também calcular outros parâmetros tais como a *Distal Delivery* de Na^+ (DD_{Na^+}), a Reabsorção Proximal Fracional de Na^+ (RPF_{Na^+}) e a Reabsorção Pós-Proximal Fracional de Na^+ ($RPPF_{\text{Na}^+}$), que permitem estimar o manuseio de sódio pelo túbulo proximal e distal (THOMSEN; NIELSEN; FLYVBJERG, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Os parâmetros acima descritos foram determinados pelas fórmulas abaixo, respectivamente:

$$DD_{\text{Na}^+} = C_{\text{Li}} \times P_{\text{Na}^+} \quad (\mu\text{Eq/min})$$

$$RPF_{\text{Na}^+} = (C_{\text{Li}} \times C_{\text{Cr}}) \times 100 \quad (\%)$$

$$RPPF_{\text{Na}^+} = (C_{\text{Na}} \times C_{\text{Cr}}) \times 100 \quad (\%)$$

Onde:

C_{Li} = Clearance de lítio (mL/min);

C_{Cr} = Clearance de creatinina (mL/min);

C_{Na} = Clearance de Na^+ (mL/min);

P_{Na+} = Concentração plasmática de Na^+ (mEq/dL)

4.4 AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA RENAL

4.4.1 Microscopia de luz

O rim esquerdo foi seccionado transversalmente e fixado por imersão em solução ALFAC (álcool 80º:formaldeído 40%:ácido acético glacial na proporção 85:10:5) por 16 horas, a 4°C. Após o processo de fixação, o material foi desidratado pela passagem em bateria de álcool 70, 80, 90, 95 e duas vezes no 100º, por 1 hora em cada solução. Com o material completamente desidratado, este permaneceu 1 hora em solução álcool 100º/Xilol (1:1), somente Xilol por 1 hora e novamente Xilol por 30 min, para a realização da diafanização. A inclusão foi feita com parafina derretida em estufa a 60°C por 2 horas e após, realizada a emblocagem do material com nova parafina.

Com a emblocagem do material, o preparo e montagem da lâmina permanente se realizaram primeiramente com a trimagem do material, para retirar o excesso de parafina. Após, no micrótomo, a microtomia para a microscopia de luz foi feita em cortes de 5µm de espessura. Assim, os cortes foram colados nas lâminas com albumina diluída em água e glicerol (1:1:1). Com os cortes colados, as lâminas foram preparadas para a coloração.

A coloração se iniciou com a hidratação do material, uma vez que o corante estará em solução aquosa e o material desidratado. Dentro da capela, as lâminas foram passadas na seguinte ordem:

- xilol I por 5 minutos;
- xilol II por 5 minutos;
- álcool 100% I por 5 minutos;

- álcool 100% II por 5 minutos;
- álcool 90% por 5 minutos;
- álcool 80% por 5 minutos;
- álcool 70% por 5 minutos;
- água destilada por 5 minutos.

Após a coloração cada lâmina passou pela desidratação, bateria de soluções descritas acima de forma inversa.

A coloração escolhida foi Hematoxilina/Eosina. Na TABELA 1 é apresentada a composição, tempo e ordem de cada solução para coloração.

TABELA 1 Composição e tempo de coloração de cada solução para microscopia de luz.

Solução	Composição	Tempo
<u>Hematoxilina/Eosina</u>		
1- Hematoxilina de Harris	Hematoxilina alcoólica 10% Sulfato de alumínio de potássio a 5% em água destilada Óxido de mercúrio a 2,5%	1min
2- Eosina Floxina	62mL de eosina 1% 6,25 mL de floxina 1% 487,5mL de álcool 95% 2,5mL de ácido acético glacial	15s

Posteriormente à coloração e desidratação as lâminulas foram dispostas sobre as lâminas com uma gota Entellan[®] para fixação. Após o tempo de secagem, estas foram analisadas em microscópio de luz em diferentes aumentos e para a captura das imagens utilizou-se uma câmera de vídeo digital (Sony[®]) acoplada em um microscópio, para posterior digitalização das imagens.

4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Após a fixação em Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 a 4°C) (KARNOVSKY, 1965), as peças foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 a 4°C. Em seguida o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 durante 1 hora. A contrastação em blocos foi realizada com acetato de uranila 2% durante 2 horas. O material foi desidratado em série alcoólica crescente por 10 min em cada concentração de álcool e em seguida colocado em acetona. A impregnação e inclusão ocorreram em resina Epon-812 (LUFT, 1961). Os cortes foram obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e de diamante.

Os cortes ultrafinos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% (WATSON, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (REYNOLDS, 1963). A observação do material foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram reportados como valores médios com seu erro padrão. Foi utilizado o teste *t* de *student* para comparar dois grupos e quando se compararam mais de dois grupos foi utilizado a Análise de Variância de uma via seguida do teste de *Student-Newman-Keulls*. O critério de significância estatística se obtém com valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 GANHO DE PESO DOS ANIMAIS, PESO TUMORAL E PESO DO RIM

As células tumorais foram inoculadas nos ratos com a idade de 90 dias de vida, sendo o 70º dia de suplementação. Antes e após os 14 dias da inoculação os ratos foram pesados para avaliar evolução de peso pelo aumento do peso tumoral. A partir destes valores, definimos o peso da carcaça que visa demonstrar peso real dos animais. O grupo portador de tumor (W) apresentou peso significativamente menor tanto em relação ao peso corporal após inoculação, como do peso da carcaça comparado ao controle (C) ($p < 0,05$). O peso da carcaça também apresentou diferença significativa no grupo portador de tumor suplementado com gordura de coco (WGC) comparado com seu controle CGC e W ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe foi capaz de modificar o quadro de perda de peso dos animais portadores de tumor, sendo que o grupo WOP apresentou ganho de peso expressivo, quando comparado ao grupo W, como demonstrado na TABELA 2.

TABELA 2 Peso (g) antes e depois da inoculação do tumor e a variação do ganho de peso dos grupos C (n=14), COP (n=12), CGC (n=15), W (n=12), WOP (n=11) e WGC (n=11). Os valores correspondem à Média \pm EPM. a $p < 0,05$ vs C e b $p < 0,05$ vs W e c $p < 0,05$ vs CGC.

Grupos	Peso corporal (g) antes da inoculação do tumor	Peso corporal (g) após 14 dias da inoculação do tumor	Peso do tumor (g)	Ganho de peso em 14 dias (g)
C	325,3 \pm 8,2	334,4 \pm 14,2	-	9,1 \pm 2,6
COP	295,2 \pm 10,4	306,1 \pm 12,8	-	10,9 \pm 3,05
CGC	318,5 \pm 11,5	326,8 \pm 14,7	-	8,3 \pm 1,59
W	297,4 \pm 13,8	302,7 \pm 11,7 ^a	15,87 \pm 0,94	-10,57 \pm 1,68 ^a
WOP	308,2 \pm 10,8	317,1 \pm 8,5	6,44 \pm 2,1 ^b	2,46 \pm 1,69 ^b
WGC	302,1 \pm 12,7	310,9 \pm 9,4	22,67 \pm 1,2 ^b	-13,87 \pm 2,17 ^{bc}

A suplementação com óleo de peixe (WOP) foi capaz de diminuir o peso da massa tumoral dos animais comparado com o grupo controle portador de tumor em

60% (W) ($p < 0.05$). Já a suplementação com gordura de coco aumentou 42% esse parâmetro em comparação com seu controle ($p < 0,05$) (FIGURA 4).

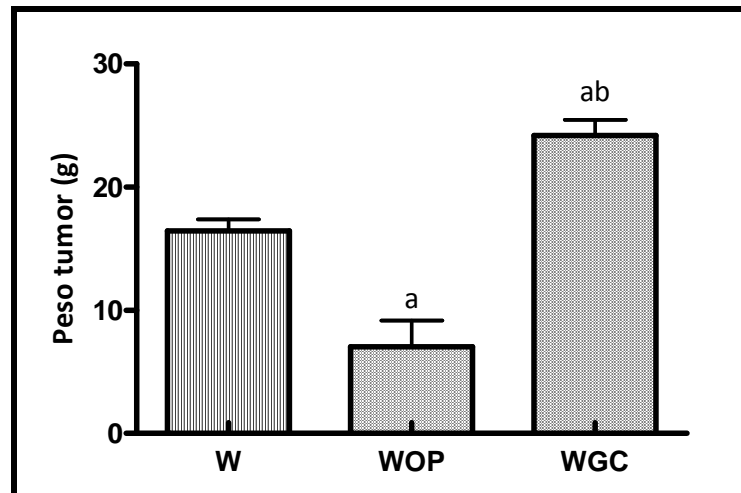


FIGURA 4 Peso do tumor (g) dos grupos tumor (W) (n=12) e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=11) e gordura de coco (WGC) (n=11). a $p < 0,05$ vs W, b $p < 0,05$ vs WOP.

O peso do rim foi normalizado pelo peso corporal dos animais. As suplementações e o quadro de câncer dos animais não modificaram este parâmetro (FIGURA 5).

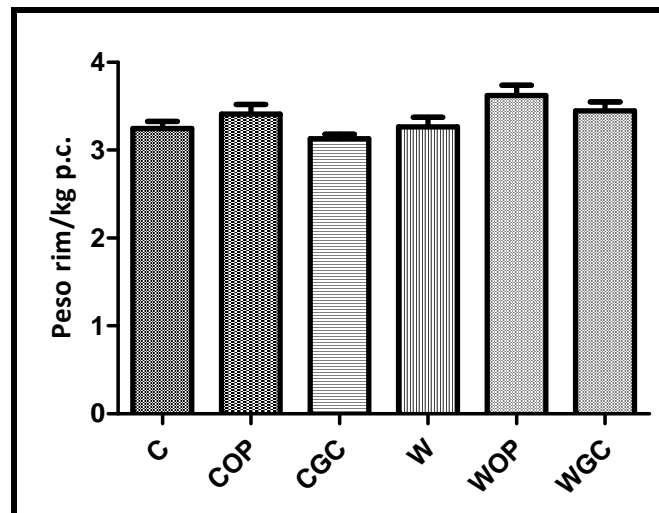


FIGURA 5 Peso do rim (g) normalizado por peso corporal (kg) dos animais dos grupos controle (C) (n=14), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=15), tumor (W) (n=12), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11).

5.2 PARÂMETROS PLASMÁTICOS E URINÁRIOS

A proteinemia dos animais portadores de tumor foi significativamente menor nos grupos portadores de tumor (W), suplementado com óleo de peixe (WOP) e com gordura de coco (WGC) comparados aos seus respectivos controles C, COP e CGC, na proporção de 14, 9 e 20%, respectivamente. Este resultado sugere que os animais encontram-se caquéticos. Além disso, nos grupos portadores de tumor, a suplementação com óleo de peixe foi capaz de aumentar significativamente a proteinemia dos animais comparados com o grupo W (FIGURA 6).

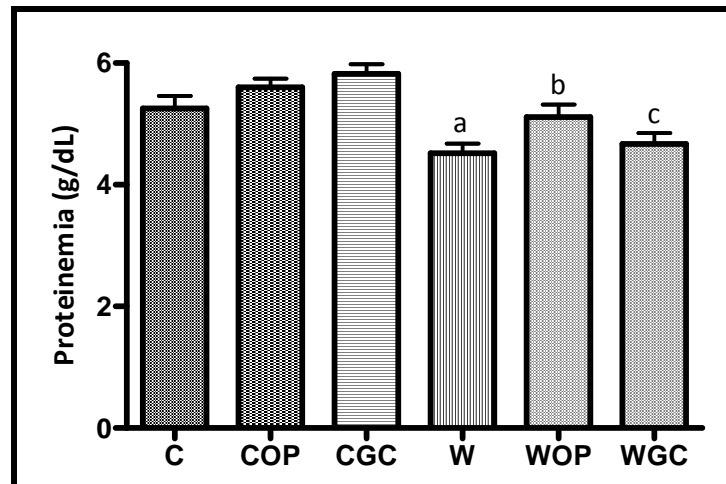


FIGURA 6 Concentração de proteínas plasmáticas totais (g/dL) dos grupos controle (C) (n=10), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=10), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=12), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=11) e gordura de coco (WGC) (n=11). a $p < 0,05$ vs C, b $p < 0,05$ vs COP e W e c $p < 0,05$ vs CGC.

A excreção urinária de proteínas não foi modificada pela suplementação com óleo de peixe ou gordura de coco. Os animais portadores do tumor de Walker apresentam uma tendência a excretar uma menor quantidade de proteínas o que é resultado provavelmente da menor concentração plasmática (FIGURA 7).

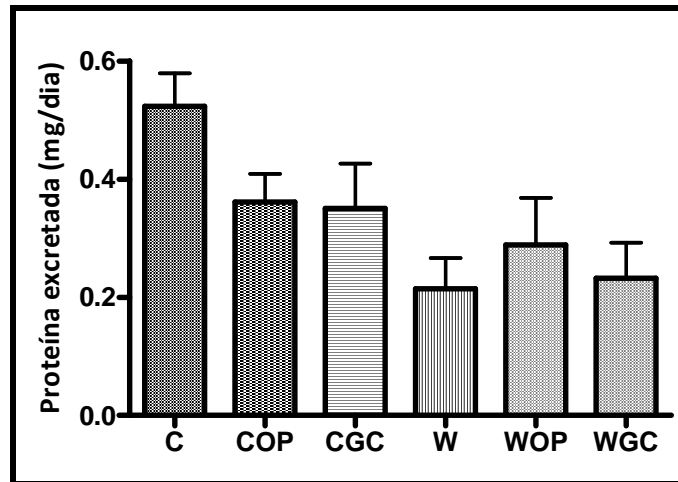


FIGURA 7 Concentração de proteínas urinárias (mg/dia) dos grupos controle (C) (n=10), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=10), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=12), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=11) e gordura de coco (WGC) (n=11).

Dois fatores que servem como indicadores indiretos da função renal são as concentrações plasmáticas de uréia e creatinina. Um aumento em sua concentração pode indicar comprometimento da função renal ou até mesmo lesões renais. A concentração de uréia plasmática não apresentou alterações significativas entre os grupos estudados (TABELA 3).

A creatinina é uma substância endógena que resulta do metabolismo da creatina nos músculos esqueléticos, sendo liberada no plasma em uma taxa relativamente constante. A quantidade produzida é proporcional à massa muscular, sendo livremente filtrável nos glomérulos. Desta forma, uma queda significativa na velocidade de filtração glomerular (VFG) determina um incremento na concentração plasmática de creatinina, entretanto a relação entre estas duas variáveis não é linear (KOOMAN, 2009). A suplementação com gordura de coco aumentou em 65 e 61% a concentração de creatinina plasmática no grupo portador de tumor (WGC) em comparação com seus controles CGC e W, respectivamente ($p < 0,05$). Os outros grupos não apresentaram alterações significativas neste parâmetro (TABELA 3).

TABELA 3 Concentração plasmática de creatinina e uréia (mg/dL) dos grupos C (n=9), COP (n=9), CGC (n=12), W (n=9), WOP (n=10) e WGC (n=9). Os valores correspondem à Média \pm EPM. a $p < 0,05$ vs CGC e W.

Grupos	Creatinina plasmática (mg/dL)	Uréia plasmática (mg/dL)
C	0,363 \pm 0,063	41,0 \pm 2,07
COP	0,348 \pm 0,038	41,9 \pm 1,81
CGC	0,333 \pm 0,050	42,6 \pm 1,78
W	0,341 \pm 0,043	40,9 \pm 1,65
WOP	0,457 \pm 0,066	45,1 \pm 2,23
WGC	0,551 \pm 0,056 ^a	43,6 \pm 2,98

5.3 PARÂMETROS DA HEMODINÂMICA RENAL

A filtração glomerular foi determinada pelo *clearance* de inulina. Esta variável não apresentou modificações significativas nos animais controle suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco. A presença do tumor não modificou o mesmo parâmetro no grupo C em relação ao W e o COP em relação ao WOP, conforme demonstrado pela FIGURA 8. Juntamente a isso, a suplementação com gordura de coco nos grupos portadores de tumor aumentou significativamente em 40 e 44% a filtração glomerular comparada ao grupo CGC e W, respectivamente ($p < 0,05$). O grupo WOP apresenta uma tendência a incremento no valor de filtração glomerular ($p = 0,53$).

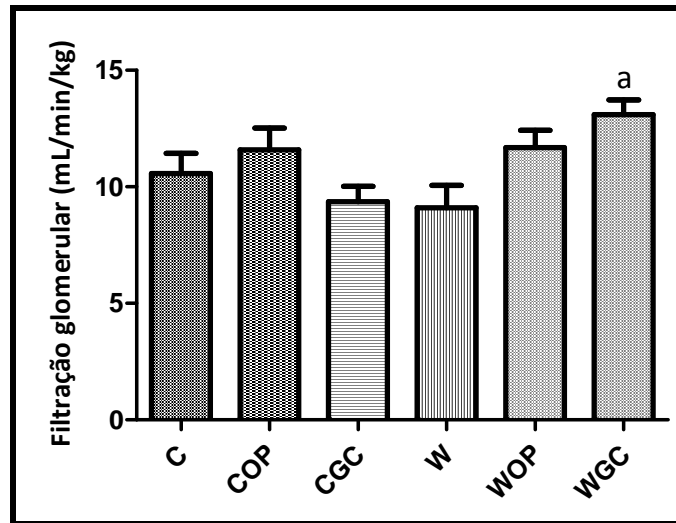


FIGURA 8 Filtração glomerular pelo *clearance* de inulina (mL/min/kg) dos grupos C (n=13), COP (n=13), CGC (n=17), W (n=6), WOP (n=8) e WGC (n=7). a $p < 0,05$ vs CGC e W.

Os valores de *clearance* de paraamino-hipúrico representam o fluxo plasmático renal. As suplementações de OP e GC aumentaram significativamente o fluxo plasmático nos grupos controles e portadores de tumor ($p < 0,05$) (FIGURA 9). Os grupos COP e CGC aumentaram em 54 e 34% em relação ao C ($p < 0,05$) e os grupos WOP e WGC em 91 e 85% os valores de fluxo plasmático renal em comparação ao grupo W ($p < 0,05$). Isso indica que os lipídeos usados nas suplementações são capazes de modificar a hemodinâmica renal induzindo vasodilatação.

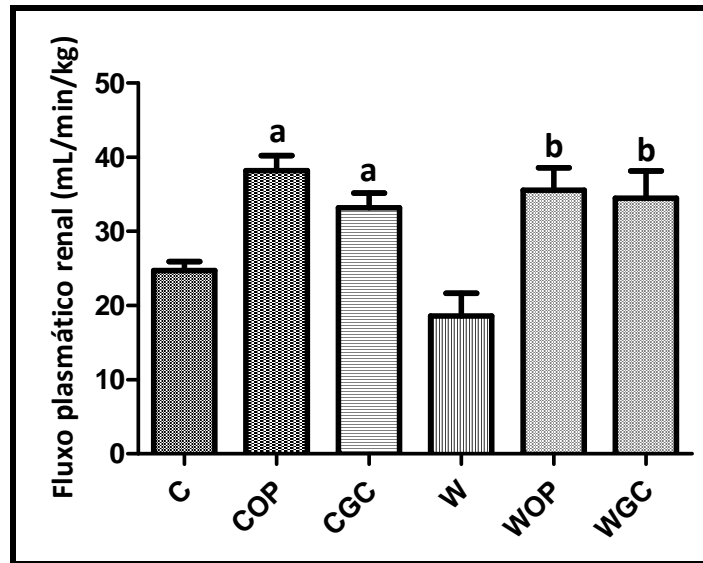


FIGURA 9 Fluxo plasmático renal pelo *clearance* de paraamino-hipúrico (mL/min/kg) dos grupos C (n=12), COP (n=15), CGC (n=19), W (n=6), WOP (n=8) e WGC (n=7). a $p < 0,05$ vs C, b $p < 0,05$ vs W.

A fração de filtração é calculada a partir dos valores de filtração glomerular e fluxo plasmático renal e corresponde à fração ou porcentagem do fluxo plasmático que atravessa o glomérulo e se transforma em filtrado glomerular. Os valores da fração de filtração, como do fluxo plasmático renal e filtração glomerular, estão na TABELA 4. O grupo dos animais controles suplementados com gordura de coco apresentou redução significativa de 35% da fração em comparação ao grupo controle correspondente (C) ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe não modificou de forma significativa este parâmetro.

TABELA 4 Valores de filtração glomerular (mL/min/kg), fluxo plasmático renal (mL/min/kg) e fração de filtração (%) dos grupos C (n=12), COP (n=15), CGC (n=19), W (n=6), WOP (n=8) e WGC (n=7). a $p < 0,05$ vs C, b $p < 0,05$ vs W e c vs CGC.

Grupos	Filtração glomerular (mL/min/kg)	Fluxo plasmático renal (mL/min/kg)	Fração de filtração (%)
C	10,57±0,869	24,74±1,21	41,24±4,43
COP	11,59±0,928	38,19±2,06 ^a	32,61±3,03
CGC	9,37±0,650	33,18±2,00 ^a	26,90±1,20 ^a
W	9,11±0,960	18,60±3,05	39,77±5,62
WOP	11,68±0,749	35,56±3,03 ^b	32,41±3,05
WGC	13,09±0,647 ^{bc}	34,48±3,66 ^b	40,68±5,00

Os valores de fluxo urinário dos animais em estudo não sofreram alterações significativas com as suplementações com óleo de peixe e gordura de coco e com a presença ou não do tumor de Walker 256 (FIGURA 10).

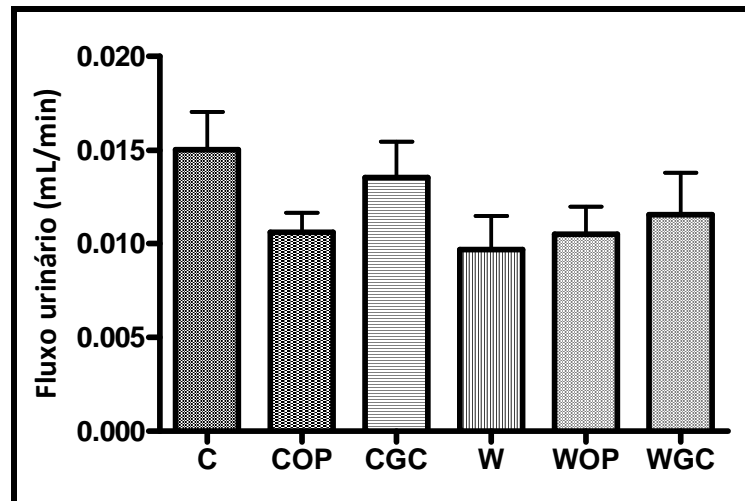


FIGURA 10 Fluxo urinário (mL/min) dos grupos controle (C) (n=13), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=15), tumor (W) (n=12), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=9).

5.4 OSMOLALIDADE PLASMÁTICA E URINÁRIA E *CLEARANCE* DE H₂O LIVRE E OSMOLAR

Os valores obtidos para as osmolalidades plasmáticas e urinárias, assim como o *clearance* osmolar e de H₂O livre são apresentados na TABELA 5 e FIGURAS 11-13. O grupo W apresenta uma osmolalidade plasmática significativamente menor que o grupo controle em 6% ($p < 0,05$). Esta queda na osmolalidade plasmática é revertida nos animais suplementados, sendo estatisticamente significativa no suplementado com gordura de coco (WGC), com aumento de 9% ($p < 0,05$). As osmolalidades urinárias foram semelhantes entre os diversos grupos estudados. Em relação aos parâmetros de *clearance* osmolar e de H₂O livre a suplementação e a presença do tumor não os modificaram. Ainda assim, o *clearance* de H₂O livre apresenta valores negativos em todos os grupos, indicando que os segmentos distais do néfron mantêm a capacidade de reabsorver água de forma significativa.

TABELA 5 Valores das osmolalidades plasmática e urinária expressas em mOsm/kgH₂O e *clearance* osmolar e de H₂O livre expressas em mL/min dos grupos controle (C) (n=12), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=10), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11). Os valores correspondem à Média ± EP. a p<0,05 vs C e b p<0,05 vs W.

Grupos	Osmolalidade Plasmática (mOsm/kgH ₂ O)	Osmolalidade Urinária (mOsm/kgH ₂ O)	Clearance Osmolar (mL/min)	Clearance de H ₂ O livre (mL/min)
C	281,3±3,4	858,5±104,7	0,041±0,005	-0,0275±0,0052
COP	288,2±3,4	839,7±85,25	0,032±0,004	-0,0186±0,0021
CGC	287,7±2,9	957,7±159,1	0,035±0,002	-0,0174±0,0021
W	266,4±6,3 ^a	879,4±120,0	0,032±0,004	-0,0231±0,0026
WOP	284,5±6,5	1030±122,3	0,035±0,003	-0,0223±0,0026
WGC	291,3±3,9 ^b	798,9±77,8	0,027±0,002	-0,0142±0,0027

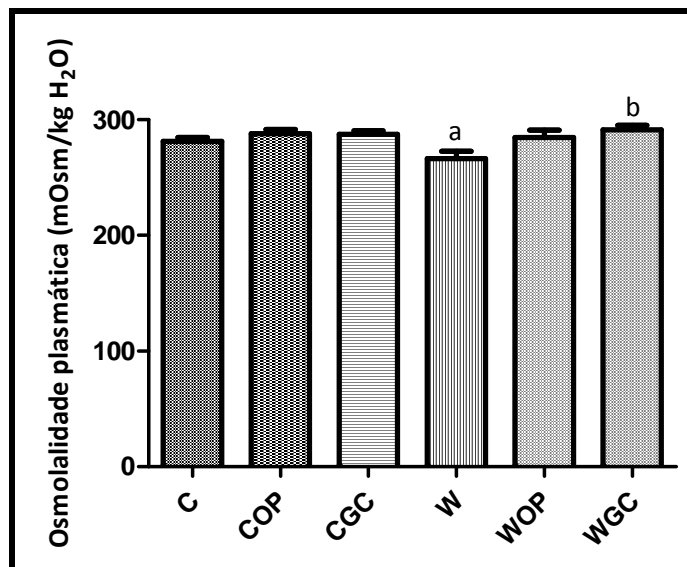


FIGURA 11 Osmolalidade plasmática (mOsm/kgH₂O) dos grupos controle (n=12), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=10), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11). Os valores correspondem à Média ± EP. a p<0,05 vs C e b p<0,05 vs W.

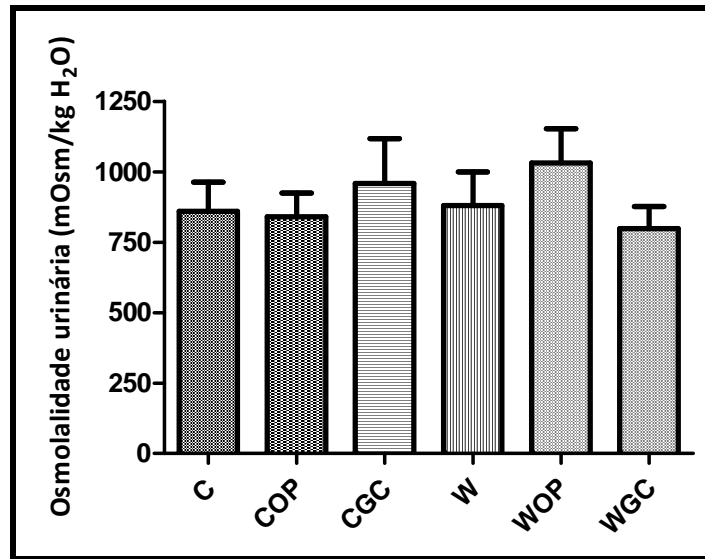


FIGURA 12 Osmolalidade urinária (mOsm/kgH₂O) dos grupos controle (n=12), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=10), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11).

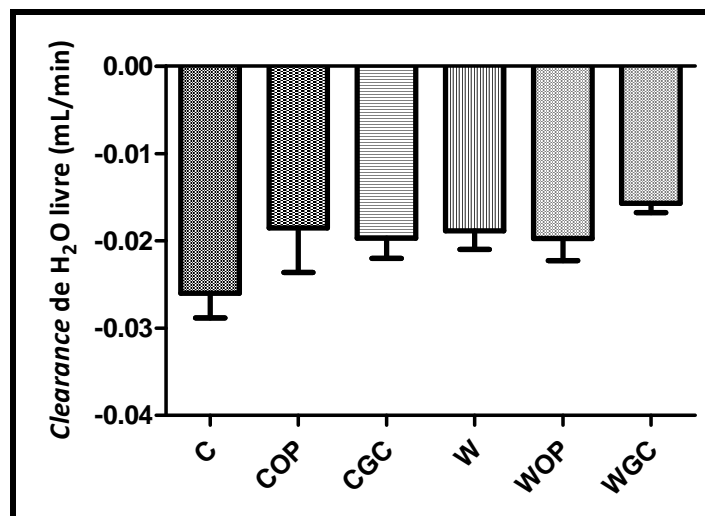


FIGURA 13 Clearance de H₂O livre (mL/min) dos grupos controle (n=12), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=10), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11).

5.5 ELETRÓLITOS

Os valores das concentrações plasmáticas de Na^+ e de K^+ estão dispostos na TABELA 6. A partir das dosagens das concentrações urinárias e do fluxo urinário foi calculada a carga excretada de Na^+ e de K^+ e a fração excretada de Na^+ (FE_{Na^+}). Os valores apresentados não sofreram modificações significativas tanto com as suplementações, quanto com a presença do tumor, exceto a concentração plasmática de K^+ que sofreu aumento de 30% no grupo portador de tumor suplementado com gordura de coco (WGC) comparado ao seu controle W ($p < 0,05$). Em relação à FE_{Na^+} observa-se uma tendência a redução nos animais controle portadores de tumor que reverte nos animais suplementados com óleo de peixe, mais sem alcançar significância estatística ($p = 0,106$).

TABELA 6 Valores das concentrações plasmáticas de Na^+ e K^+ (mEq/dL), carga excretada de Na^+ e K^+ ($\mu\text{Eq}/\text{min}$) e fração de excreção (FE) (%) de Na^+ nos grupos C (n=11), COP (n=11), CGC (n=12), W (n=10), WOP (n=12) e WGC (n=12). Os valores correspondem à Média \pm EPM. a $p < 0,05$ vs W.

Grupos	[Na^+] plasmática (mEq/dL)	Carga Excretada de Na^+ ($\mu\text{Eq}/\text{min}$)	FE Na^+ (%)	[K^+] plasmática (mEq/dL)	Carga Excretada de K^+ ($\mu\text{Eq}/\text{min}$)
C	152,6 \pm 3,35	1,153 \pm 0,15	1,249 \pm 0,36	3,19 \pm 0,196	1,048 \pm 0,21
COP	148,8 \pm 3,53	0,823 \pm 0,18	1,256 \pm 0,40	3,68 \pm 0,305	0,936 \pm 0,19
CGC	146,7 \pm 1,57	0,875 \pm 0,11	0,987 \pm 0,29	3,77 \pm 0,159	0,895 \pm 0,14
W	153,3 \pm 3,02	0,776 \pm 0,15	0,879 \pm 0,21	3,03 \pm 0,168	1,102 \pm 0,18
WOP	148,9 \pm 4,08	0,976 \pm 0,11	1,614 \pm 0,38	3,17 \pm 0,169	1,095 \pm 0,16
WGC	144,1 \pm 4,58	0,754 \pm 0,17	1,201 \pm 0,31	3,96 \pm 0,217 ^a	1,003 \pm 0,20

O *clearance* de lítio (C_{Li}) foi realizado com a finalidade de estimar o transporte de sódio no túbulo proximal e o aporte deste íon aos segmentos distais do néfron. Este método se fundamenta na evidência de que a absorção de lítio no túbulo proximal ocorre na mesma proporção daquela observada para sódio e água, e de que virtualmente nenhum lítio é reabsorvido nos segmentos distais. Desta forma, a fração de excreção de lítio (FE_{Li}) é indicativa do transporte de sódio nos túbulos proximais (THOMSEN; SHIRLEY, 1997). A partir dos valores de *Clearance* de lítio e das

concentrações plasmáticas de Na^+ é possível também calcular outros parâmetros, tais como a *Distal Delivery* de Na^+ (DD_{Na^+}), a Reabsorção Proximal Fracional de Na^+ (RPF_{Na^+}) e a Reabsorção Pós-Proximal Fracional de Na^+ ($\text{RPPF}_{\text{Na}^+}$), que permitem estimar o manuseio de sódio pelo túbulo proximal e distal (THOMSEN; NIELSEN; FLYVBJERG, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A suplementação com gordura de coco diminuiu significativamente, em 38%, o *clearance* de lítio comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). Já a suplementação com óleo de peixe e a presença do tumor não afetaram de forma significativa este parâmetro, como demonstrado na FIGURA 14.

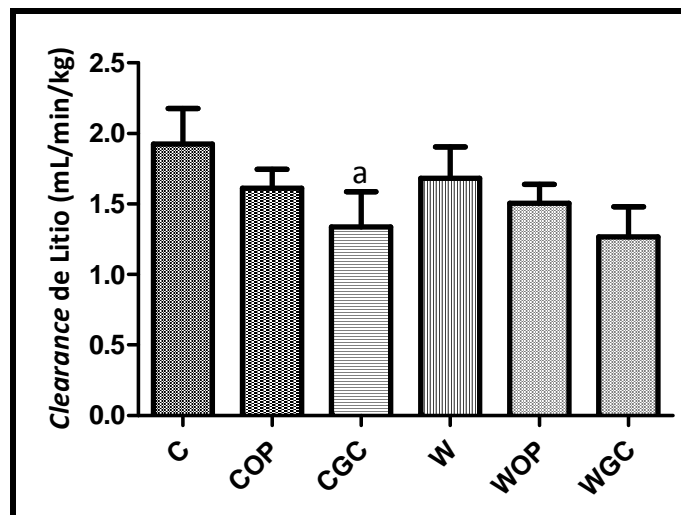


FIGURA 14 Clearance de lítio (mL/min/kg) dos grupos controle (C) (n=12), suplementado com óleo de peixe (COP) (n=13), com gordura de coco (CGC) (n=13), tumor (W) (n=10), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) (n=13) e gordura de coco (WGC) (n=11). a $p < 0,05$ vs C.

Na TABELA 7 verifica-se os valores da FE_{Li} , DD_{Na^+} , RPF_{Na^+} e $\text{RPPF}_{\text{Na}^+}$. Os dados de fração de excreção de lítio, que pode ser denominada como fração de excreção proximal de Na^+ , indicam uma redução deste parâmetro no grupo CGC em relação ao grupo controle, entretanto, o grupo WGC aumentou em 70% a FE_{Li} comparado ao grupo CGC ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe não modificou este parâmetro. No caso dos valores da Reabsorção Proximal Fracional de Na^+ (RPF_{Na^+}) observa-se um incremento no grupo CGC em relação ao controle e uma

redução de 45% no grupo WGC vs CGC ($p < 0,05$). A redução observada no C_{Li} e na FE_{Li} no grupo controle suplementado com gordura de coco indicam um estímulo na reabsorção proximal de Na^+ neste grupo, o que é congruente com o resultado encontrado na RPF_{Na^+} .

O termo *distal delivery*, ou aporte distal de sódio é calculado a partir do *clearance* de lítio multiplicado pela concentração de sódio plasmática e representa a carga de Na^+ que deixa os segmentos proximais dos néfrons em direção aos túbulos distais. O grupo C apresenta o maior valor do aporte distal de Na^+ , os grupos experimentais tendem a diminuir este parâmetro, mas somente o grupo CGC diminuiu significativamente (em aproximadamente 50%) o parâmetro comparado com o grupo controle C ($p < 0,05$). Em relação à reabsorção pós-proximal de Na^+ , a $RPPF_{Na^+}$, a suplementação com gordura de coco gera aumento de 85% neste fator comparado ao seu controle (C vs CGC, $p < 0,05$). Isso se reverte na presença do tumor, onde o grupo WGC reduz a 32% o valor do grupo CGC ($p < 0,0001$). Estes resultados sugerem um estímulo na reabsorção fracional distal de Na^+ no grupo suplementado com gordura de coco, o que é revertido nos animais deste grupo portadores do tumor.

TABELA 7 Fração de Excreção de Lítio (FE_{Li}) (%), Reabsorção Proximal Fracional de Na^+ (RPF_{Na^+}), *Distal Delivery* de Na^+ (%), e a Reabsorção Pós-Proximal Fracional de Na^+ ($RPPF_{Na^+}$) (%) dos grupos controle (C) ($n=7$), suplementado com óleo de peixe (COP) ($n=7$), com gordura de coco (CGC) ($n=9$), tumor (W) ($n=7$), e tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) ($n=5$) e gordura de coco (WGC) ($n=4$). a $p < 0,05$ vs C, b $p < 0,05$ vs CGC e c $p < 0,0001$ vs CGC.

Grupos	FE_{Li} (%)	RPF_{Na^+} (%)	DD_{Na^+} ($\mu Eq/min$)	$RPPF_{Na^+}$ (%)
C	58,76 \pm 6,166	41,24 \pm 6,166	94,08 \pm 11,86	1,380 \pm 0,2014
COP	63,55 \pm 9,490	36,45 \pm 9,490	82,08 \pm 7,873	1,244 \pm 0,2997
CGC	43,56 \pm 5,021	56,44 \pm 5,021	47,15 \pm 5,782 ^a	2,560 \pm 0,3365 ^a
W	60,53 \pm 5,872	40,80 \pm 6,765	76,94 \pm 11,510	1,070 \pm 0,2405
WOP	58,81 \pm 7,703	41,19 \pm 7,703	76,55 \pm 8,509	1,604 \pm 0,2772
WGC	74,34 \pm 14,23 ^b	25,67 \pm 14,23 ^b	70,09 \pm 14,28	0,8307 \pm 0,1241 ^c

5.6 AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA RENAL

5.6.1 Microscopia de luz

O material foi registrado em objetiva de 40x com zoom de 2,1x em que 1cm da imagem representa 100 μ m do real. Alguns dos resultados foram selecionados e estão demonstrados na FIGURA 15.

A técnica de microscopia de luz foi realizada com os grupos experimentais com a coloração de Hematoxilina/Eosina, coloração esta que apresenta coloração aniônica, cora núcleo na cor arroxeadada, e coloração catiônica, corando citoplasma na cor rosada.

De acordo com a FIGURA 15 é possível perceber que as estruturas renais apresentam-se intactas, com preservação da estrutura glomerular, túbulos renais e espaço intersticial. Nos grupos experimentais, a utilização das suplementações de óleo de peixe ou gordura de coco, ou ainda, a presença do tumor não foram capazes de modificar a histologia do tecido renal. Uma possível explicação se dá pela suplementação de um tipo de gordura apenas alterar produtos de metabolismo que atuam de forma rápida, não modificando a histologia do tecido. Da mesma forma, o tumor utilizado não gera metástase e o estado caquético que o acompanha não altera de forma expressiva a morfologia tecidual.

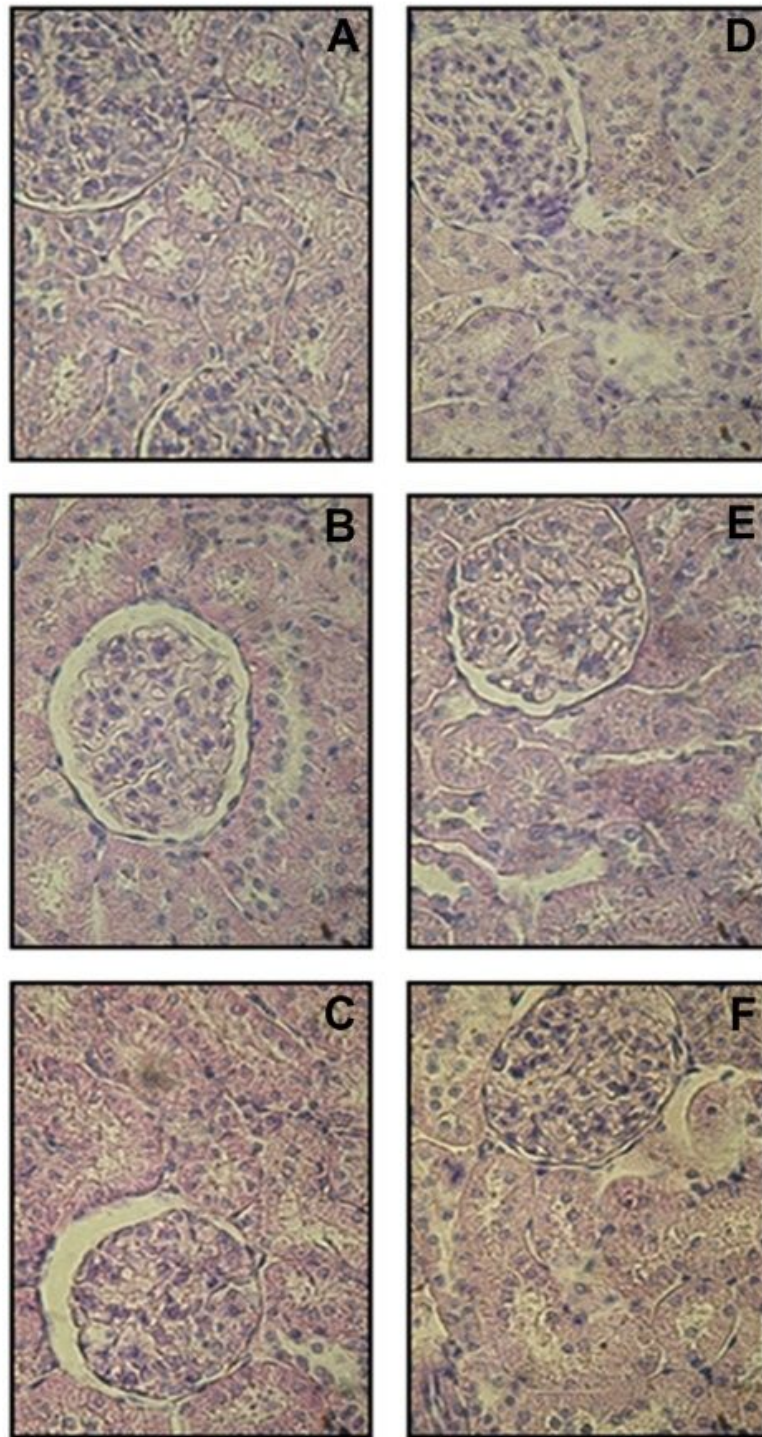


FIGURA 15 Imagem digitalizada da técnica de microscopia de luz com coloração de Hematoxilina e Eosina de tecido renal com focalização de glomérulo e estruturas tubulares. **A** – grupo controle (C); **B** – grupo controle suplementado com óleo de peixe (COP); **C** – grupo controle suplementado com gordura de coco (CGC); **D** – grupo portador de tumor (W); **E** – grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe (WOP); **F** – grupo portador de tumor suplementado com gordura de coco. Aumentos de 40x e zoom de 2,1x.

5.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A digitalização das imagens de microscopia eletrônica foi realizada com os grupos controles, controles suplementados e portadores de tumor suplementados (C; COP e CGC; WOP e WGC). Na FIGURA 16 é possível perceber células tubulares, enquanto as FIGURAS 17-20 demonstram o glomérulo em grande aumento. A focalização de diferentes estruturas renais dificulta a comparação do grupo controle com os grupos experimentais. Todavia, é possível perceber que as fenestras e processos podais epiteliais apresentam o mesmo aspecto nos espaço glomerular dos grupos controles e portadores de tumor suplementados (COP, CGC, WOP e WGC) (FIGURAS 17-20). Este fato indica que a presença do tumor não afetou a ultraestrutura da barreira de filtração glomerular.

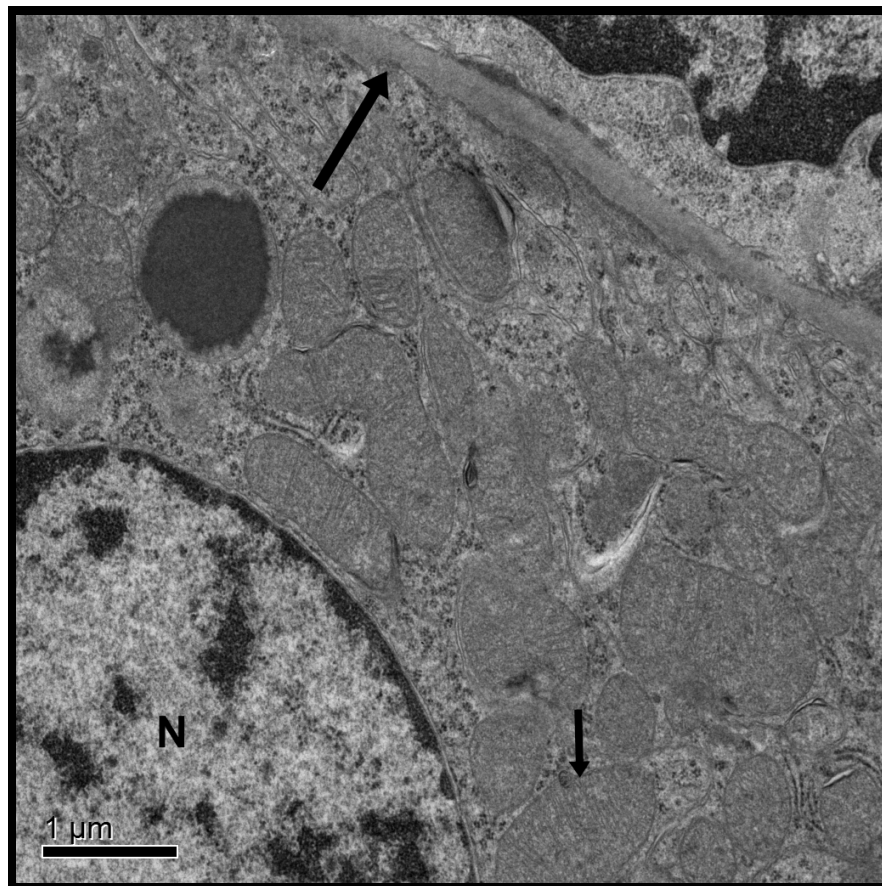


FIGURA 16 Eletromicrografia do tecido renal. Identificação de célula tubular, com evidência do núcleo (N), seta maior indicando membrana plasmática intacta e seta menor com evidência de mitocôndria. Análise do grupo controle (C) em aumento de 25000x.



FIGURA 17 Eletromicrografia do tecido renal. Identificação de estruturas glomerulares, seta maior evidencia processos podais e seta menor fenestras de filtração intactos. Análise do grupo controle suplementado com óleo de peixe (COP) em aumento de 40000x.

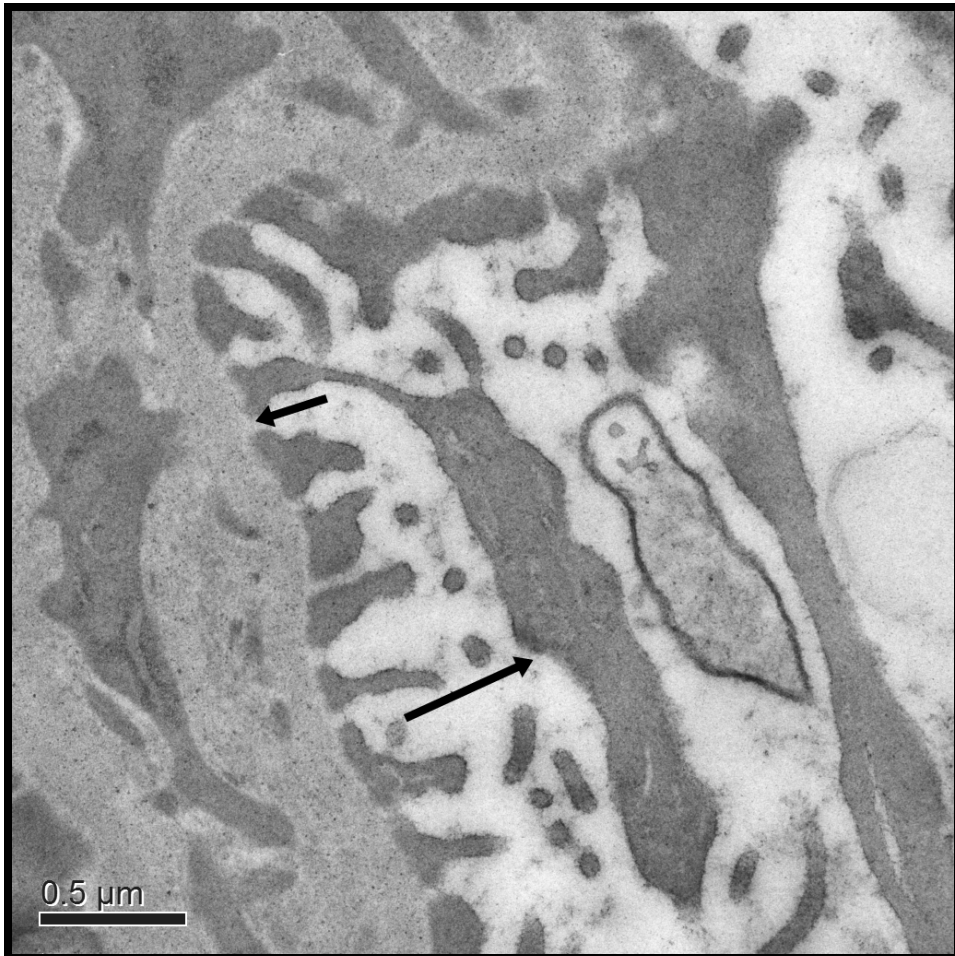


FIGURA 18 Eletromicrografia do tecido renal. Identificação de estruturas glomerulares, seta maior evidencia processos podais e seta menor, fenestras de filtração intactos. Análise do grupo controle suplementado com gordura de coco (CGC) em aumento de 40000x.

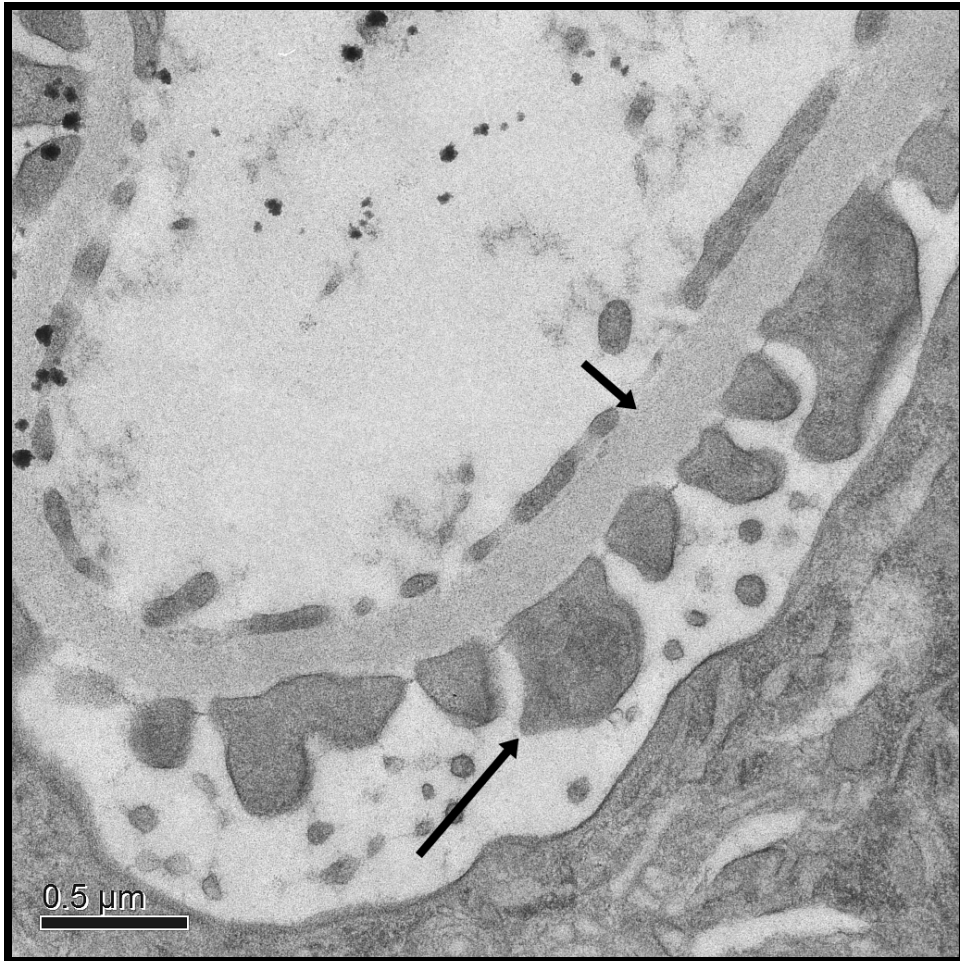


FIGURA 19 Eletromicrografia do tecido renal. Identificação de estruturas glomerulares, seta maior evidencia processos podais e seta menor, fenestras de filtração intactos. Análise do grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe (WOP) em aumento de 40000x.

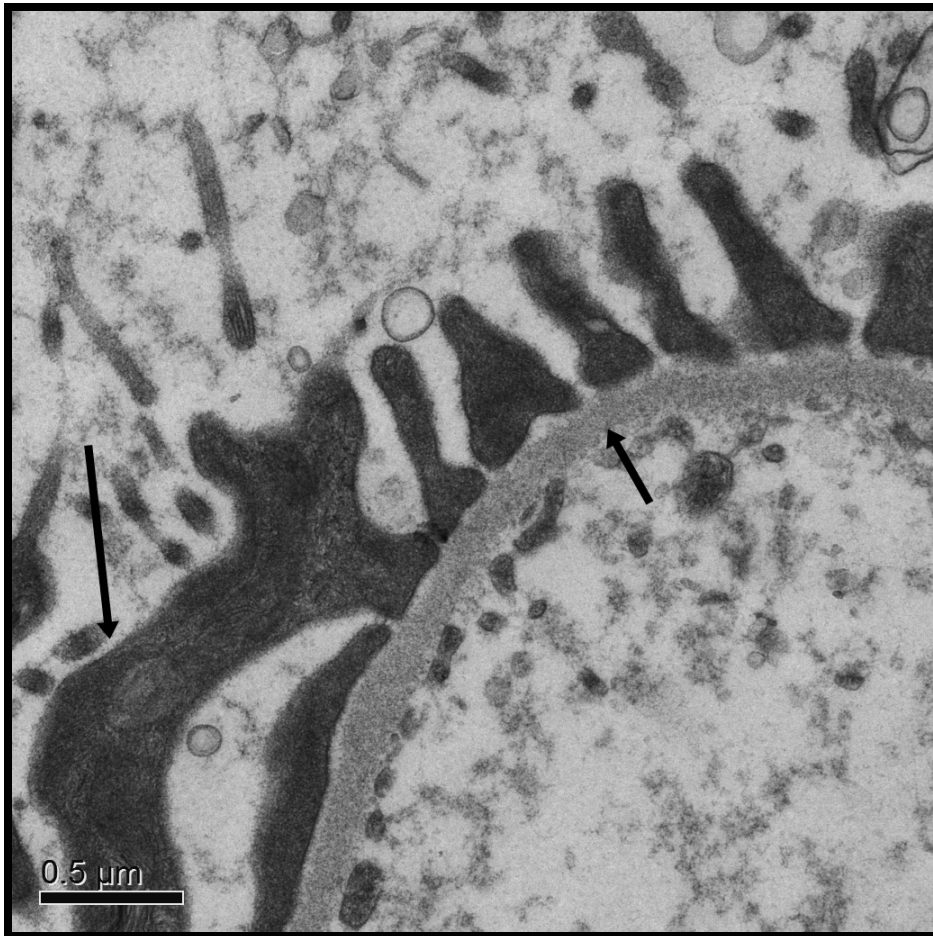


FIGURA 20 Eletromicrografia do tecido renal. Identificação de estruturas glomerulares, seta maior evidencia processos podais e seta menor, fenestras de filtração intactos. Análise do grupo portador de tumor suplementado com gordura de coco (WGC) em aumento de 40000x.

6 DISCUSSÃO

A interação entre os fatores genéticos e os ambientais é a base para o desenvolvimento dos processos de saúde ou doença. A nutrição é o fator ambiental de maior importância, sendo que modificações na dieta como aumento no consumo de alimentos industrializados, ricos em gordura saturada e açúcares refinados, e a alta ingestão de ácidos graxos n-6, em detrimento da família n-3, contribuem principalmente para o desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer, diabetes, falência renal, doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, entre outras (SIMOPOULOS, 2008).

O interesse dos potenciais benefícios dos ácidos graxos da classe n-3, presentes no óleo de peixe, emergiram desde os anos 50. As primeiras evidências encontradas na baixa incidência de doenças cardiovasculares em populações Esquimós que consumiam altas concentrações de gordura na dieta alimentar. Ao investigar esta população, percebeu-se a ingestão elevada de ácidos graxos poliinsaturados n-3. Essas observações levaram a pesquisar os benefícios e efeitos preventivos em doenças cardiovasculares, artrite reumatóide e asma, e a encorajar o consumo de alimentos e suplementos alimentares ricos em AGPI da família ômega 3 (RIEDIGER *et al.*, 2009).

A suplementação crônica com diferentes tipos de gordura realizada neste trabalho objetivou mimetizar a situação de consumo continuado destes lipídeos por um indivíduo, da infância até a vida adulta, e verificar o impacto desta suplementação sobre a função renal em indivíduos saudáveis e em portadores de tumor, e ainda, sobre o crescimento tumoral surgido na maturidade e suas possíveis alterações ao indivíduo.

Conforme demonstrado na TABELA 8, o perfil de ácidos graxos encontrado por IAGHER (2008) na ração dos animais determina o predomínio de ácido graxos da série n-6 no total de lipídeos da amostra. Este fato demonstra que a razão n-6/n-3 consumidos pelos animais controle deste estudo é similar à achada na dieta humana ocidental.

TABELA 8 Perfil de ácidos graxos (g/100g de ácidos graxos totais), obtido por HPLC (*High performance liquid chromatography*) das cápsulas de óleo de peixe, gordura de coco e da ração administrada aos animais. Os valores correspondem à Média \pm EPM.

Ácidos graxos	Óleo de peixe	Gordura de coco	Ração Nuvital® (AR-1)
Láurico (12:0)	3,4 \pm 0,7	45,3 \pm 3,1	-
Mirístico (14:0)	9,8 \pm 0,4	17,0 \pm 0,9	-
Palmitico (16:0)	25,3 \pm 3,0	23,6 \pm 4,8	20,7 \pm 3,8
Palmitoléico (16:1n-7)	6,5 \pm 0,1	-	-
Esteárico (18:0)	2,1 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	2,3 \pm 0,04
Oléico (18:1n-9)	10,2 \pm 0,9	8,0 \pm 0,7	19,5 \pm 1,5
Linoléico (18:2n-6)	2,0 \pm 0,7	2,8 \pm 0,2	51,3 \pm 4,2
Linolênico (18:3n-3)	0,7 \pm 0,2	-	5,0 \pm 0,2
Araquidônico (20:4n-6)	0,9 \pm 0,2	-	0,1 \pm 0,07
EPA (20:5n-3)	20,2 \pm 1,3	1,8 \pm 0,2	-
DHA (22:6n-3)	18,8 \pm 1,2	-	-

Fonte: modificada de IAGHER, 2008, p.73.

Para identificar o crescimento tumoral e suas alterações ao indivíduo foi utilizado um modelo animal com tumor de Walker, cujas células quando inoculadas subcutaneamente no flanco direito dos animais, formam uma massa tumoral sólida de crescimento rápido com a geração da caquexia em duas semanas.

O aumento do consumo de gordura saturada, com diminuição de AGPI n-3, ao longo os anos, elevou a prevalência de doenças crônicas degenerativas, como o câncer. Neste estudo a utilização da suplementação de 1g/kg peso corporal de óleo de peixe reduziu em 59% a massa tumoral dos animais quando comparados ao grupo não suplementado (WOP vs W). A suplementação com gordura de coco, na mesma concentração, uma gordura saturada, elevou em 43% o crescimento da massa tumoral comparados ao grupo controle (WGC vs W) (FIGURA 4). Estes dados são corroborados com estudos que utilizaram o mesmo modelo experimental (PIZATO *et al.*, 2005; MUND *et al.* 2007).

De acordo com MUND e colaboradores (2007), o papel do óleo de peixe sobre a redução do crescimento tumoral pode ser explicado em parte pelo aumento da taxa de apoptose e diminuição da proliferação das células tumorais *ex vivo* induzido pelo AGPI n-3 em animais suplementados com OP, dados encontrados em seu trabalho.

A gordura de coco, um dos suplementos utilizados neste estudo, é composta em sua maioria de ácidos graxos saturados, sendo que os principais são os chamados ácidos graxos de cadeia média (AGCM), que compreendem mais de 45% do percentual de lipídeos totais, de acordo com o perfil de ácidos graxos apresentados por IAGHER (2008), sendo o mesmo suplemento usado neste trabalho (TABELA 8).

Os AGCM são os compostos de 6 a 12 carbonos, presentes em diversos tipos de alimentos, como manteiga, cremes frescos, leite, óleo de palma e gordura de coco, como mencionado acima. A estrutura química destes AG os confere propriedades metabólicas distintas dos ácidos graxos de cadeia longa, a absorção é independente de quilomícrons, sendo absorvidos através dos enterócitos até a veia porta e ligados à albumina, vão diretamente ao fígado, onde são transportados à mitocôndria e são oxidados rapidamente. Esta é a principal característica destes compostos, a alta capacidade de absorção e oxidação os faz importantes na preparação de soluções para nutrição enteral e parenteral em pacientes em estado crítico (LABARTHE; GÉLINAS; Des ROSIERS, 2008; TAKEUCHI *et al.*, 2008). Esta característica metabólica pode ser a possível explicação de como o tumor apresenta crescimento maior que o grupo controle. A suplementação pode levar ao organismo e, conseqüentemente ao tumor, energia de forma rápida e gerar maior desenvolvimento tumoral.

A caquexia é uma síndrome multifatorial caracterizada por progressiva perda de peso, principalmente perda de proteínas musculares, acompanhado, frequentemente, pela anorexia. A caquexia nos pacientes com câncer é comum, visto que, as terapias utilizadas como quimioterapias, radioterapias e cirurgias, e, ainda, a própria presença do tumor, levam a anorexia e perda de peso (BARBER, 2001; TISDALE, 2009).

O tumor de Walker 256 depois de inoculado gera a caquexia em 14 dias. Os animais foram pesados nos dia 0 e 14^o da inoculação, avaliando assim o ganho de peso neste período. O peso do animal considerado foi o peso da carcaça, valor considerado pela diminuição do valor da massa tumoral do peso total. Os animais não portadores de tumor apresentaram ganho de peso normal, independente da suplementação. Já os animais portadores de tumor reduziram o peso desde a inoculação das células tumorais, com valores negativos de crescimento com exceção da suplementação com óleo de peixe, que reverteu o quadro e gerou crescimento nos animais (WOP vs W)

(TABELA 2), dados estes também encontrados em estudos de PIZATO *et al.* (2005) e MUND *et al.* (2007).

A proteólise muscular e a perda de tecido adiposo são as duas principais características geradas pela perda de peso em indivíduos caquéticos. A perda de tecido adiposo ocorre primeiramente devido ao aumento da lipólise, uma vez que há elevação do *turnover* de glicerol e ácidos graxos livres (AGL) comparados em indivíduos normais ou com câncer sem perda de peso. Em modelo *in vitro* de adipócitos (3T3-L1) estimulados com dexametasona, o ácido eicosapentaenóico (EPA), pertencente ao grupo dos AGPI n-3, atenua o aumento da lipólise e reduz a glicoproteína- α_2 ligada ao zinco (ZAG), sendo que sua alta expressão é relacionada com o aumento da lipólise. Este fato sugere uma das formas que os AGPI n-3 podem atuar sobre o tratamento do câncer e, neste caso, a atuação ocorre na principal alteração que o tumor pode trazer ao indivíduo (TISDALE, 2009).

A menor ingestão alimentar gerada pela anorexia, associado com a perda de peso e a presença de substâncias produzidas pelo tumor, como o fator de indução de proteólise (PIF), ocorre intensa proteólise muscular e utilização das reservas corporais como fonte energética, iniciando um quadro de desnutrição (PIZATO *et al.*, 2005). A proteinemia pode ser um fator que indique o grau de caquexia dos animais portadores de tumor, encontrado neste trabalho, quando comparado aos grupos controles (W vs C; WOP vs COP; WGC vs CGC). A albumina é a principal proteína plasmática e a diminuição da sua produção e, conseqüentemente, menores valores plasmáticos, está relacionado com a caquexia, podendo ser a proteína responsável pela diminuição da proteinemia encontrados nos animais portadores de tumor (FIGURA 6) (BARBER, 2001).

Ainda sim, a suplementação de óleo de peixe foi capaz de reverter o quadro de hipoproteinemia, comparados ao grupo W (FIGURA 6). Essa capacidade do óleo de peixe se deve a possível diminuição de citocinas próinflamatórias, como interleucina (IL) -1 α e β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) nos pacientes com câncer. A liberação dessas citocinas produzidas pelo tumor ou pelo sistema imunitário do indivíduo está relacionada à anorexia, que pode gerar perda de massa corporal, proteólise muscular e hipoproteinemia, dado encontrado nos grupos portadores de tumor e portadores de

tumor suplementados com gordura de coco (BARBER, 2001; TISDALE, 2009).

Essas citocinas com características próinflamatórias são transportadas através da barreira hematocefálica onde interagem com a superfície luminal das células endoteliais cerebrais para liberar substâncias que afetam o apetite. Receptores para TNF e IL-1 são encontrados nas áreas hipotalâmicas, onde o apetite é regulado. A anorexia induzida tanto pelo TNF quanto pela IL-6 pode ser bloqueada por inibidores da ciclooxigenase, sugerindo que prostaglandina, derivada das reações realizadas pela ciclooxigenase, como a PGE₂, atua diretamente como mediador de supressão de apetite (BARBER, 2001; FEARON *et al.*, 2006; MUND *et al.*, 2007; TISDALE, 2009).

Além da proteinemia, a proteinúria poderia indicar o quadro da caquexia, mas no presente trabalho não foi encontrado este padrão (FIGURA 7). Além de poder indicar o quadro de caquexia, a presença significativa de proteínas na urina pode representar falência renal por um excesso de filtração glomerular de proteínas plasmáticas como consequência de lesão na barreira de filtração glomerular. Os resultados apresentados na FIGURA 7 indicam que as suplementações e/ou a presença do tumor não geram lesão renal desta magnitude. Este ponto foi confirmado pelas imagens de microscopia de luz e eletrônica que não mostraram nenhuma alteração significativa na morfologia da região glomerular (FIGURAS 15 a 20).

6.1 ÁCIDOS GRAXOS E FUNÇÃO RENAL

O rim é um órgão vital, que desempenha diferentes papéis essenciais no crescimento e desenvolvimento de indivíduos saudáveis e apresenta importante papel em diversas doenças. A principal função do rim é a manutenção do volume dos líquidos corporais e do equilíbrio ácido-base destes meios (DOUGLAS, 2001; PRIYAMVADA *et al.*, 2008; BERNE; LEVY; KOEPPEN, 2009). Essas funções fisiológicas renais são parcialmente dependentes da via enzimática da COX e de seus produtos, ex: eicosanóides. Onde ativam a regulação do tônus vascular e a homeostase de sal e água pela modulação da hemodinâmica glomerular e pelo ajuste na função do néfron distal (AGUILA *et al.*, 2005).

Recentes estudos sugerem a associação entre os ácidos graxos poliinsaturados e o desenvolvimento de doenças crônicas renais. As doenças crônicas renais emergem como um dos maiores problemas de saúde pública entre os adultos e idosos e podem resultar em doença renal de estágio final com necessidade de diálise ou transplante. Nos EUA, estima-se que 19 milhões de adultos estejam no estágio inicial da doença e em estudo realizado na Europa, o PREVEND (*The Prevention of Renal and Vascular End-Stage Disease*), detectou que mais de 12% da população adulta apresenta algum grau de insuficiência renal (LAURETANI *et al.*, 2008).

Anormalidades lipídicas e o metabolismo de lipoproteínas aterogênicas podem contribuir para injúria glomerular e intersticial e progressão da doença renal. Em modelos animais, a suplementação com AGPI foi capaz de reduzir a fibrose e a inflamação renal. Os AGPI podem proteger a função renal pela modulação da resposta inflamatória, induzindo menor produção de citocinas próinflamatórias, redução da atividade da ciclooxigenase (COX)-2 e na expressão de moléculas endoteliais de adesão leucocitárias (LAURETANI *et al.*, 2008).

Mediadores lipídicos formados a partir dos ácidos graxos apresentam papel importante na regulação renal de processos hemodinâmicos e não-hemodinâmicos. Os eicosanóides derivados do ácido araquidônico incluem os prostanóides participantes de eventos inflamatórios e hemodinâmicos no rim. Tem sido demonstrado que a suplementação com AGPI n-3 possibilita a redução do conteúdo de ácido araquidônico na membrana celular, cujos metabólitos participam de processos de cunho inflamatório, oxidativo e trombótico, e se tem o aumento das concentrações de ácido docosahexaenóico e eicosapentaenóico, cujos metabólicos atenuam estes processos (AN *et al.*, 2009).

No presente trabalho, a suplementação com óleo de peixe ocorreu tanto em animais saudáveis, quando em animais portadores de tumor. Como a suplementação se faz desde o desmame até a fase adulta, uma correlação feita seria do papel dessa suplementação crônica e suas possíveis alterações na função renal em indivíduos adultos normais e, além disso, após esta suplementação, quais seriam as consequências na função renal juntamente com a presença de uma doença se instalando, como o câncer.

A função renal pode ser avaliada indiretamente por alterações nas concentrações plasmáticas de uréia e creatinina (KOOMAN, 2009). A uréia, que é quantitativamente o maior produto do metabolismo protéico, não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados, conforme demonstrado na TABELA 3.

A creatinina é um produto da quebra de creatina e fosfocreatina, ácidos orgânicos nitrogenados envolvidos no metabolismo energético das células musculares esqueléticas. Aumento das concentrações de creatinina indica diminuição da VFG, sendo que os valores deste metabólito são influenciados fortemente pela massa muscular do indivíduo. Assim, pacientes que apresentam redução da massa muscular, como em doenças crônicas, pode apresentar valores reduzidos de VFG mesmo com valores normais de creatinina plasmática (KOOMAN, 2009). A concentração sérica de creatinina do grupo portador de tumor suplementado com gordura de coco (WGC) apresentou valores aumentados se comparados aos seus controles, grupo suplementado com GC (CGC) e portador de tumor (W), de acordo com TABELA 3. A suplementação com OP não apresentou efeito neste parâmetro e a presença do tumor também não o modificou. A presença do tumor por si só gera perda de massa corporal, podendo mascarar alterações no padrão de creatinina plasmática e como o grupo WGC apresentou o maior valor de massa tumoral e menor ganho de peso, é possível que o aumento da creatinina plasmática esteja relacionado com o grau de proteólise muscular neste grupo.

O rim apresenta grande capacidade de manter a estabilidade do fluxo sanguíneo evitando desta forma modificações significativas na filtração glomerular. Esta regulação é normalmente atribuída a: a) alta eficiência de autorregulação do fluxo plasmático renal em resposta a variações na pressão arterial sistêmica, sistema *feedback* tubuloglomerular (FTG); b) influência de fatores humorais que modulam resistências vasculares renais (BLANTZ *et al.*, 2007; BERNE; LEVY; KOEPPEN, 2009). Os mediadores do FTG são: adenosina trifosfato (ATP) e adenosina, um produto do metabolismo de adenosina monofosfato (AMP); ainda assim outros fatores interferem na atividade deste sistema: óxido nítrico (NO), angiotensina II e, potencialmente, produtos da ciclooxigenase-2 (BLANTZ *et al.*, 2007).

O metabolismo do ácido araquidônico, ácido graxo poliinsaturado n-6, nos rins

tem como via principal a COX, onde seus produtos modulam a ação de outros autacóides e hormônios, e ações na hemodinâmica renal, com correlação em declínio da função renal em algumas enfermidades (MATTIX; BADR, 2001; AGUILA *et al.*, 2005; HAO; BREYER, 2008). Como a família de AGPI n-3 compete com os da família n-6 para produção de produtos via COX, sendo que estes produtos estão relacionados com a hemodinâmica renal, é justo que a suplementação com n-3 poderia apresentar algum papel oposto ou amenizando os papéis desenvolvidos pelo consumo indiscriminado de alimentos ricos em n-6, como vasodilatação e atividade no *feedback* tubuloglomerular (BLANTZ *et al.*, 2007).

A velocidade de filtração glomerular (VFG) é o principal parâmetro para avaliação da função renal, sendo que uma estimativa fidedigna é crucial para identificar processos de doença renal. O marcador ideal para determinação da VFG necessita ser uma molécula inerte, livremente filtrada pelos glomérulos, não secretada ou reabsorvida pelos túbulos renais e, ainda, não ser sintetizada ou metabolizada pelo rim. Inulina, um polissacarídeo exógeno, apresenta todas estas propriedades. Sendo assim, conseqüentemente o *clearance* de inulina realizado por infusão intravenosa contínua é considerado como “padrão ouro” na determinação da VFG em condições experimentais, tanto em estudos com animais como com seres humanos, principalmente crianças (VAN ROSSUM *et al.*, 2005; KAKUTA *et al.*, 2010).

A aferição da VFG neste trabalho, a partir do *clearance* de inulina, apresentou modificações estatisticamente significativas apenas no grupo portador de tumor suplementado com gordura de coco comparado aos grupos controles CGC e W. A suplementação com óleo de peixe no grupo controle e portador de tumor gera uma tendência ao aumento da VFG, por apresentar características vasodilatadoras, mas não modificou o parâmetro significativamente, o mesmo encontrado por LOGAN, MICHAEL e BENSON (1992), em suplementação dos animais controles por um mês. Entretanto, SCHMITZ *et al.* (1991) observou um incremento significativo da filtração por néfron de ratos estudados por micropunção. As diferenças observadas entre estes estudos podem ser atribuídas a diferenças no tempo de suplementação e a quantidade de óleo de peixe presente na dieta. Por exemplo, no estudo citado (SCHMITZ *et al.*, 1991) o tempo de suplementação foi de 4 a 6 semanas e no presente estudo 10 a 12 semanas.

Também, no trabalho de SCHMITZ *et al.* (1991) os animais foram alimentados com uma ração padrão suplementada com 18% de óleo de peixe (aproximadamente 0,8g de n-3 por dia) e os nossos animais foram suplementados com menos de 1% (aproximadamente 0,07g de n-3 por dia). Em relação ao grupo controle portador de tumor, a filtração glomerular apresentou menor valor o que reverteu nos animais suplementados, resultado semelhante ao encontrado por FERNANDEZ *et al.* (2004).

O fluxo plasmático renal, o maior determinante da VFG, é mensurado pelo *clearance* de paraamino-hipúrico (PAH) tanto na área clínica como laboratorial. A aplicação é baseada pelo PAH ser praticamente depurado na sua totalidade ao passar pelo rim (VISSCHER *et al.*, 1995; AGARWAL, 2002).

Neste estudo, o fluxo plasmático renal (FPR) apresentou-se aumentado nos grupos suplementados com OP e GC controles e portadores de tumor, comparado aos grupos controles C e W. Nos grupos sem tumor suplementados o aumento do FPR não foi acompanhado de um aumento significativo da VFG, o que explica a tendência a redução na fração de filtração. Este resultado sugere que a suplementação está induzindo uma vasodilatação preferencial da arteríola eferente, semelhante ao observado no estudo de SCHMITZ *et al.* (1991). Trabalhando com voluntários humanos com suplementação com OP na dose de 6g/dia, DUSING *et al.* (1990) observaram também incremento significativo no fluxo plasmático renal e diminuição na resistência vascular renal.

O aumento do FPR observada nos grupos suplementados pode ser explicado pela competição ocorrida pelos compostos lipídicos das suplementações na produção de prostanóides moduladores do fluxo plasmático renal. O óleo de peixe, rico em EPA e DHA, gera prostaglandinas e tromboxanos da série 3 e leucotrienos da série 5, com características vasodilatadoras, diferentemente dos derivados do ácido araquidônico, tais como tromboxanos e prostaglandinas da série 2 e leucotrienos da série 4, que apresentam ações vasoconstritoras (ÁGUILA *et al.*, 2005; HAO; BREYER, 2008).

A composição de ácidos graxos representada pela TABELA 8 demonstra uma pequena semelhança entre a composição do óleo de peixe e a composição da gordura de coco. O EPA, ácido graxo predominante no OP, aparece em pequenas concentrações na GC, sendo inexistente na ração habitual. A presença do EPA, mesmo

em baixa concentração, na GC pode possivelmente explicar o aumento do fluxo plasmático renal nos grupos CGC e WGC, onde o EPA aparece competindo na produção de eicosanóides moduladores da hemodinâmica renal.

Os prostanóides derivados da COX apresentem papel fundamental na modulação do fluxo plasmático renal e da velocidade de filtração glomerular. O prostanóide mais abundante detectado nos rins é o derivado do ácido araquidônico, a prostaglandina (PG) E₂, seguido pela PGI₂, PGF_{2α} e tromboxano (TX) A₂ (HAO; BREYER, 2008)

Os receptores para prostaglandinas compreendem uma família de receptores ligados à proteína G, que incluem prostanóides D, E e F. Os receptores para prostanóides E (EP) apresentam similar resposta em ligantes PG das séries 2 e 3, sendo que pode existir isoformas mais sensíveis à PGE₃ que para PGE₂ (SMITH, 2005; HAO; BREYER, 2008).

A PGE₂ exerce efeito dilatador na arteríola aferente e, se contrapondo a isto, apresenta papel importante na liberação de renina e indiretamente de angiotensina que têm ações de contração das arteríolas renais, reduzindo o FPR e VFG. Visto este fato, o deslocamento da via de produção de PGE₂ – derivado do ácido araquidônico (AGPI n-6) – para produção de PGE₃ – derivado do ácido eicosapentaenóico (AGPI n-3) – deverá modificar as ações sobre a hemodinâmica, como aumento da FPR e VFG (MATTIX; BADR, 2001).

No presente estudo e como já foi citado anteriormente, a suplementação com óleo de peixe, rico em EPA, foi capaz de deslocar a via de produção de PGE₂ em relação ao FPR, onde ocorre vasodilatação nos grupos suplementados controles e nos portadores de tumor. A suplementação com gordura de coco, mesmo apresentado concentrações de ácidos graxos da família n-3 baixas, modificou os mesmos parâmetros relacionados às ações destes prostanóides.

Como citado acima, o rim cumpre um papel fundamental na regulação da homeostase hidroeletrolítica, em particular regulando o volume e a osmolalidade do compartimento extracelular. Isto está relacionado à capacidade renal de excretar uma urina de volume e osmolalidade variáveis, como resultado de um controle estrito da reabsorção tubular de Na⁺ e água (BORON; BOULPAEP, 2005; BERNE; LEVY;

KOEPPEN, 2009). A partir das concentrações plasmáticas de Na^+ e dos valores de osmolalidade plasmática é possível inferir informações a cerca de condições clínicas, como a retração de interstício ou alterações dos valores de hormônio antidiurético (ADH) (GONÇALVES *et al.*, 2005).

No presente experimento, a osmolalidade plasmática foi reduzida no grupo portador de tumor, possivelmente por diminuição da proteinemia e da glicemia que acompanham o estado de caquexia, visto que a concentração de Na^+ plasmática não apresentou mudanças. As suplementações nos grupos portadores de tumor reverteram a diminuição da osmolalidade plasmática (TABELA 5 e FIGURA 11). A capacidade do rim de concentração e diluição urinária esta preservada em todos os grupos estudados, visto que não houve diferenças significativas na osmolalidade urinária entre os grupos, e nem no *clearance* de H_2O livre (TABELA 5 e FIGURAS 12 e 13). Os valores de osmolalidade urinária e *clearance* de H_2O livre negativo são indicativos de níveis adequados de ADH e de uma correta reabsorção de água pelos segmentos distais do néfron. Desta forma tanto a suplementação com OP e GC, quanto a presença do tumor não modificaram a capacidade renal de reter água livre de soluto.

No estado de caquexia tem sido observada uma ingestão de água proporcionalmente maior que a de alimento. Isto tem sido atribuído a uma retenção de água associada com uma retenção de Na^+ resultante de um incremento na secreção de aldosterona e/ou uma secreção inapropriada de ADH (BLACKBURN *et al.*, 1977; De CATERINA *et al.*, 1994). No presente trabalho encontramos uma clara tendência à redução na carga excretada de Na^+ e na FE_{Na^+} nos animais controle portadores de tumor o que foi revertido nos animais suplementados (ver TABELA 6). Uma clara relação entre o crescimento tumoral e a retenção renal de Na^+ tem sido estabelecida por TOAL *et al.* (1961), quem observou um retorno à excreção urinaria normal deste íon após a remoção do tumor.

A realização do *clearance* de lítio nos permitiu estimar o que está acontecendo com o manejo tubular de Na^+ nestes animais. Em particular a FE_{Li} e a RPF_{Na^+} foram utilizadas para avaliar o manejo do sódio pelo túbulo proximal. No caso da suplementação com GC nos portadores de tumor, o grupo apresenta aumento significativo da FE_{Li} e uma redução da RPF_{Na^+} em relação ao grupo CGC, indicando

uma redução na reabsorção proximal de Na^+ neste grupo. A suplementação com óleo de peixe parece não interferir com a reabsorção de Na^+ neste segmento.

A partir dos valores de *clearance* de lítio é possível calcular outros parâmetros relacionados com o manejo tubular de sódio pelos segmentos distais do néfron, tais como aporte distal de sódio e reabsorção pós-proximal fracional de sódio, representados como DD_{Na^+} , e $\text{RPPF}_{\text{Na}^+}$, respectivamente. A suplementação com GC foi o único fator modificante nestes casos, tanto nos grupos controles, quanto nos portadores de tumor. A reabsorção de sódio se apresenta aumentada no grupo CGC na porção pós-proximal e conseqüentemente, o aporte distal de sódio se reduz (DD_{Na^+} de CGC vs C). Já a presença do tumor reverte o quadro, apresentando uma redução na $\text{RPPF}_{\text{Na}^+}$ comparado ao grupo controle CGC.

CHAGNAC e colaboradores (2008) avaliaram o papel da obesidade no manejo tubular de sódio e verificaram que em humanos obesos ocorre hiperfiltração glomerular, com aumento da fração de filtração e maior reabsorção proximal tubular de sódio, o que sugere o surgimento da hipertensão em indivíduos obesos. A gordura de coco, composta de ácidos graxos saturados em sua maioria, pode ser relacionada com algumas características presentes em indivíduos obesos. Características essas como o aumento das concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL-colesterol e ácidos graxos livres apresentados no quadro de obesidade, sendo os principais fatores relacionados com alto risco de doenças cardíacas (COX *et al.*, 1995; MERCHANT *et al.*, 2008). Em relação aos ácidos graxos saturados com ação na elevação da colesterolemia, o ácido láurico e o mirístico são os que apresentam maior papel sobre o colesterol total. Sendo que estes dois ácidos graxos compõem a maioria de lipídeos da GC, pode-se relacionar a suplementação com GC com a obesidade. Neste estudo, é apresentado modificações no manejo tubular de sódio no grupo suplementado com GC da mesma forma que o estudo com grupo obeso de CHAGNAC *et al.* (2008). Infelizmente neste trabalho não foram aferidos valores de lipídemia dos animais para relacionar com o papel aterogênico da GC, mas é possível que a suplementação com GC possa alterar o perfil lipídico dos animais e alterar o manejo tubular de sódio (COX *et al.*, 1995; CHAGNAC *et al.*, 2008; MERCHANT *et al.*, 2008).

O K^+ constitui o principal cátion intracelular e o controle do seu balanço é

fundamental para a sobrevivência do indivíduo. No presente trabalho podemos perceber que houve aumento dos valores plasmáticos de potássio pelo grupo portador de tumor suplementado com gordura de coco, sendo este o grupo que apresentou maior crescimento tumoral e déficit de ganho de peso, além da menor proteinemia, comparados aos grupos com tumor de Walker. ELEJALDE (2004) evidencia que nos pacientes com câncer, alterações metabólicas podem ocorrer frequentemente. As principais alterações seriam: hipercalcemia, hiponatremia, acidose láctica, hiperuricemia, insuficiência renal, hiperamonemia, hiper ou hipocalemia, hipoglicemia, entre outros.

De acordo com a avaliação da histologia renal, desde a microscopia de luz, com menores aumentos, ou com a microscopia eletrônica de transmissão, em grandes aumentos, verificou-se que a morfologia das estruturas do tecido renal não foi modificada com o delineamento experimental. Na FIGURA 15 é demonstrada a seleção de fotografias digitalizadas da técnica de microscopia de luz com coloração de hematoxilina e eosina. Pode-se perceber que o tecido apresenta-se intacto com a presença do glomérulo e túbulos com a estrutura preservada, com ausência de dilatação ou retração do espaço de filtração glomerular ou da luz tubular em todos os grupos. Da mesma forma, SCHMITZ *et al.* (1991) trabalhando com a técnica de ácido periódico de Schiff também não encontraram diferenças significativas na morfologia glomerular entre os grupos suplementados e o controle.

No caso da técnica de microscopia eletrônica de transmissão ocorreram imprevistos, onde não se conseguiu o registro das imagens do grupo experimental portador de tumor e no grupo controle não foi possível identificar imagens condizentes com os outros grupos que seriam o glomérulo com a focalização em maior aumento das estruturas podais. Neste contexto, a comparação dos outros grupos fica prejudicada pela falta de um grupo controle para análise. Entretanto, se formos analisar as estruturas glomerulares percebemos que aparentemente as células apresentam-se uniformes, com a estrutura da barreira de ultrafiltração (fenestras e processos podais) preservada e íntegra em todos os grupos observados, com um aspecto semelhante ao encontrado na literatura em animais controle adultos. Desta forma é possível concluir que a suplementação com ou sem a presença do tumor não modifica a ultraestrutura glomerular.

Estudos com tumor de Walker mostram que a presença do tumor além de reduzir o ganho ponderal, como encontrado neste trabalho, também é capaz de gerar a síndrome da caquexia por um curto período de tempo, identificado pela hipoglicemia, hiperlactatemia, hipertriacilglicerolemia e baixo conteúdo de glicogênio hepático, indicando grau de catabolismo das reservas corporais (LIMA *et al.*, 2008). Após a inoculação do tumor, em apenas 14 dias estes indivíduos estão com grande massa tumoral e caquéticos. Por ser um intenso, porém pequeno, período na presença do tumor, provavelmente o tumor não é capaz de gerar substâncias com atuação na morfologia tecidual do organismo do animal. Os produtos do metabolismo do tumor, como citocinas próinflamatórias, o PIF, entre outras, podem apresentar alterações no equilíbrio hidroeletrólítico do organismo, mas não modificando as estruturas renais de forma expressiva (FERNANDEZ *et al.*, 2004).

A dieta ocidental se modificou ao longo dos anos, com o aumento do consumo de gordura saturada e desbalanço da ingestão de ácidos graxos n-6 e n-3. Inicialmente, este trabalho se propôs verificar qual o papel dos AGPI n-3 na função renal e juntamente a isso, verificar a ação de uma suplementação rica em ácidos graxos saturados poderia contribuir para o esclarecimento da atuação do n-3 sobre parâmetros da função renal. Durante o trabalho, foi-se percebendo que os grupos suplementados com GC geravam resultados dos parâmetros renais similares ao OP e distantes dos grupos controles. Percebe-se que a composição lipídica é diferente do OP, mas não na sua totalidade. Crêem-se então, que a suplementação com outro lipídeo, como ácido graxo n-6 poderia apresentar melhores resultados frente ao n-3, mostrando maiores disparidades. Entretanto, tornou-se importante a identificação de ácidos graxos que inicialmente não apresentavam forte relação com a hemodinâmica renal, apresentaram fortes resultados em determinantes parâmetros da função renal.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, a função renal de animais controles e portadores de tumor suplementados com óleo de peixe e gordura de coco foi avaliada, sendo que alguns parâmetros relacionados à caquexia dos animais também foram mensurados.

A suplementação com óleo de peixe reverteu o quadro de caquexia dos animais portadores de tumor, aumentando o ganho de peso e a proteinemia, e reduzindo o peso tumoral, parâmetros estes agravados com a suplementação com gordura de coco.

Entre as dosagens bioquímicas, a suplementação com gordura de coco e a presença do tumor aumentaram a concentração plasmática de creatinina e de potássio. A proteinúria, uremia, as concentrações plasmáticas e urinárias de Na^+ e a osmolalidade urinária não foram modificadas pelos grupos experimentais.

Em relação à hemodinâmica renal, o fluxo urinário não sofreu alteração, entretanto as suplementações geraram aumento do fluxo plasmático renal o que é indicativo de vasodilatação. A suplementação com óleo de peixe no grupo controle e portador de tumor gera uma tendência ao aumento da VFG, por apresentar características vasodilatadoras, mas não modificou este parâmetro de forma significativa.

O manejo tubular de sódio, avaliado a partir do *clearance* de lítio, sofreu alterações particularmente pela suplementação com gordura de coco, já que os controles suplementados apresentaram estímulo para reabsorção proximal de sódio e a presença do tumor com esta mesma suplementação reverteu o quadro reduzindo a reabsorção proximal deste íon.

Ainda sim, a presença do tumor e as suplementações lipídicas não foram capazes de modificar a histologia do tecido renal, visto análises realizadas por microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

Analisando o estado geral e a função renal destes animais de modo geral, podemos concluir que:

- o óleo de peixe reduz os elementos de caquexia nos animais portadores de tumor e apresenta um papel renoprotetor ao aumentar o fluxo plasmático renal e preservar a filtração glomerular.

- A suplementação com óleo de peixe não apresenta efeitos deletereos sobre a função renal dos animais controle, entretanto os efeitos a longo prazo precisam ser estudados.
- A gordura de coco gerou mudanças sobre parâmetros da hemodinâmica renal e manejo tubular de sódio, sendo que a presença do tumor modificou estes parâmetros de forma mais expressiva.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R. Rapid microplate method for PAH estimation. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.283, p.236-241, 2002.
- AGUILA, M. B. *et al.* Different edible oil beneficial effects (canola oil, fish oil, palm oil, olive oil, and soybean oil) on spontaneously hypertensive rat glomerular enlargement and glomeruli number. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v.76, p.74-85, 2005.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.
- ALEXANDER, J. W. Immunonutrition: the role of n-3 fatty acids. **Nutrition**, v.14, p.627-633, 1998.
- AN, W. S. *et al.* Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.297, p.895-903, 2009.
- ARONSON, W. J. Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oil in men with prostate cancer. **Urology**, v.58, n.2, p.283-288, 2001.
- BABA, N. H.; GHOSSOUB, Z.; HABBAL, Z. Differential effects of dietary oils on plasma lipids, lipid peroxidation and adipose tissue lipoprotein lipase activity in rats. **Nutrition Research**, v.20, n.8, p.1113-1123, 2000.
- BARBER, M. D. Cancer cachexia and its treatment with fish-oil-enriched nutritional supplementation. **Nutrition**, v.17, p.751-755, 2001.
- BAYORH, M. A. *et al.* Effects of MaxEPA on salt-induced hypertension: relationship to [3H]nitrobenzylthioinosine binding sites. **Clinical and Experimental Hypertension**, v.18, n.1, p.37-49, 1996.
- BERGMAYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. Florida: Wiley-VCH Publishers, 1985. p. 449-453.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M. **Fisiologia**, 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- BHATTACHARYA, A. *et al.* Different ratios of eicosapentaenoic and docosahexaenoic omega-3 fatty acids in commercial fish oils differentially alter pro-inflammatory cytokines in peritoneal macrophages from C57BL/6 female mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, p.23-30, 2007.
- BLACKBURN, G. L. *et al.* The effect of cancer on nitrogen, electrolyte and mineral metabolism. **Cancer Research**, v.37, p.2348-2353, 1977.

BLANTZ, R. C. *et al.* Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v.118, p.23-43, 2007.

BORON, W.; BOULPAEP, E. **Medical Physiology**. 2.ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2005.

BRAHIMI-HORN, C. M.; CHICHE, J.; POUYSSEGUR, J. Hypoxia and cancer. **Journal of Molecular Medicine**, v.85, p.1301-1307, 2007.

BROWN, S. A. *et al.* Effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation in early renal insufficiency in dogs. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.135, n.3, p.275-286, 2000.

CALDER, P. C. Dietary arachidonic acid: harmful, harmless or helpful? **British Journal of Nutrition**, v.98, p. 451-453, 2007.

_____. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale. **Nutrition Research**, v.21, p. 309-341, 2001.

_____. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.75, p.197-202, 2006.

CHAGNAC, A. *et al.* Obesity-induced glomerular hyperfiltration: its involvement in the pathogenesis of tubular sodium reabsorption. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.23, p.3946-3952, 2008.

COX, C. *et al.* Effects of coconut oil, butter, and safflower oil on lipids and lipoproteins in persons with moderately elevated cholesterol levels. **Journal of Lipid Research**, v.36, p.1787-1795, 1995.

De CATERINA *et al.* N-3 fatty acids and renal diseases. **American Journal of Kidney Disease**, v.24, p.397-415, 1994.

De PABLO, M. A. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.29, p.323-328, 2000.

DOLEGOWSKA, B. *et al.* Metabolism of eicosanoids and their action on renal function during ischaemia and reperfusion: the effect of alprostadil. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.75, p.403-411, 2006.

DONADIO J. V. n-3 Fatty acids and their role in nephrologic practice. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.10, p.639-642, 2001.

DOUGLAS, C. R. **Patofisiologia de sistemas renal**. São Paulo: Robe Editorial, 2001.

- DUNLOP, R. J., CAMPBELL, C. W. Cytokines and advanced cancer. **Journal of Pain and Symptom Management**, v.20, n.3, p.214-232, 2000.
- DUSING, R. *et al.* Effects of n-3 fatty acids on renal function and renal prostaglandin E metabolism. **Kidney International**, v.38, n.2, p.315-319, 1990.
- EDELMAN, M. J. *et al.* Serotonergic blockade in the treatment of the cancer anorexia-cachexia syndrome. **Cancer**, v.86, n.4, p.684-688, 1999.
- ELEJALDE, J. L. Urgencias metabólicas en el paciente oncológico. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v.27, p.53-62, suplemento., 2004.
- FERNANDES, L. C. *et al.* Improvement of cancer cachexia and decrease of Walker 256 tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Therapy Control**, v.1, p.259-268, 1991.
- FERNANDEZ, R. *et al.* 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.
- FERNANDEZ, R.; MALNIC, G. Secretion of $\text{HCO}_3^-/\text{OH}^-$ in cortical distal tubule of the rat. **Journal Membrane Biology**, v.143, p.227-235, 1995.
- FEARON, K. C. H. *et al.* Double-blind, placebo-controlled, randomized study of eicosapentaenoic acid diester in patients with cancer cachexia. **Journal of Clinical Oncology Original Report**, v.24, n.21, p.3401-3407, 2006.
- FRITSCHKE, K. Fatty acids as modulators of the immune response. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, p.45-73, 2006.
- FUEHR, J.; KACZMARCZYK, J.; KRUTTGEN, C. D. A simple colorimetric method of inulin determination in renal *clearance* studies on metabolically normal subjects and diabetics. **Wien Klin Wochenschr**, v.33, p.729-730, 1955.
- GIACOSA, A. *et al.* Food intake and body composition in cancer cachexia. **Nutrition**, v.12, p.20-23, suplemento., 1996.
- GONÇALVES, J. G. *et al.* Condutividade urinária: um método simples para estimar a concentração iônica e a osmolalidade. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.27, n.4, p.192-195, 2005.
- HAO, C.; BREYER, M. D. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. **Annual Review of Physiology**, v. 70, p. 357-377, 2008.
- HENRY, R. J.; CANNON, D. C. WINKEKMAN, J. W. **Clinical Chemistry, Principles and Technics**. 2ed. New York: Harper & Row, 1974.

IAGHER, F. **Efeito da suplementação conjunta crônica com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe sobre crescimento tumoral, caquexia e atividade linfocitária de ratos wistar portadores de tumor de Walker 256**. 140f. (Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JIANG, W. G.; BRYCE, R. P.; HORROBIN, D. F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Oncology Hematology**, v.27, p.179-209, 1998.

JUMP, D. B. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.11, p.8755–8758, 2002.

KAKUTA, Y. *et al.* Utility of the Japanese GFR estimation equation for evaluating potential donor kidney function. **Clinical and Experimental Nephology**, v.14, n.1, p.63-67, 2010.

KARMALI R. A. Historical perspective and potential use of n-3 fatty acids in therapy of cancer cachexia. **Nutrition**, v.12, p.2-4, suplement.,1996.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.

KITCHENER, S. J.; DOURISH, C. T. An examination of the behavioural specificity of hypophagia induced by 5HT_{-1B}, 5HT_{-1C} and 5HT₂ receptor agonist using the post-prandial satiety sequence in rats. **Psychopharmacology**, v. 113, p. 369-377, 1994.

KOOMAN, J. P. Estimation of renal function in patients with chronic kidney disease. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v.30, p.1341-1346, 2009.

LABARTHE, F.; GÉLINAS, R.; Des ROSIERS, C. Medium-chain fatty acids as metabolic therapy in cardiac disease. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v.22, p.97-106, 2008.

LAURETANI, F. *et al.* Plasma polyunsaturated fatty acids and the decline of renal function. **Clinical Chemistry**, v.54, n.3, p.475-481, 2008.

LEONARD, W. Food for thoughts. **Scientific American**, p.74-83, 2002.

LIMA, C. *et al.* Anaerobic exercise reduces tumor growth, cancer cachexia and increases macrophage and lymphocyte response in Walker 256 tumor-bearing rats. **European Journal of Applied Physiology**, v.104, n.6, p.957-964, 2008.

LOGAN, J. L.; MICHAEL, U. F.; BENSON, B. Dietary fish oil interferes with renal arachidonic acid metabolism in rats: correlations with renal physiology. **Metabolism**, v. 41, n. 4, p. 382-389, 1992.

- LOMBARDO, Y. B.; CHICCO, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, p.1-13, 2006.
- LUFT, F. C. Cachexia has only one meaning. **Journal of Molecular Medicine**, v.85, p.783-785, 2007.
- LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v.9, p. 409-414, 1961.
- MATTIX, H. J.; BADR, K. F. Arachidonic Acid Metabolites in the Kidney. In: **The Kidney**. Edited by BRENER, B. M., 2001, Chapter 18.
- MERCHANT, A. T. *et al.* Interrelation of saturated fat, trans fat, alcohol intake, and subclinical atherosclerosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, p.168-174, 2008.
- MEYDANI, S. N. Effects of (n-3) polyunsaturated fatty acids on cytokine production and their biologic function. **Nutrition**, v. 12, p. 8-14, suplem., 1996.
- MUND, R. C. *et al.* Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.76, p.113-120, 2007.
- OLIVEIRA, P. C. de *et al.* Effect of nitric oxide synthase inhibition and saline administration on blood pressure and renal sodium handling during experimental sepsis in rats. **Renal Failure**, v.25, n.6, p.897-908, 2003.
- PLATA-SALAMÁN, C. R. Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome. **Nutrition**, v.16, p.1009-1012, 2000.
- PIZATO, N. *et al.* Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition and Cancer**, v.53, n.2, p.194-201, 2005.
- PRIYAMVADA, S. *et al.* Studies on the protective effect of dietary fish oil on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.78, p.369-381, 2008.
- RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A. N.; GONTIJO, J. R. Re-assessment of the renal hydrosaline dysfunction in rats bearing the Walker-256 tumor. **Renal Failure**, v.22, p.769-784, 2000.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.

RIEDIGER, N. D., *et al.* A systemic review of the role of n-3 fatty acids in health and disease. **Journal of the American Dietetic**, v.109, p.668-679, 2009.

ROSE, D. P.; CONOLLY, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology and Therapeutics**, v.83, p.217-244, 1999.

RUXTON, C. H. S. *et al.* The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **Journal of Human Nutrition & Dietetics**, v.17, p.449-459, 2004.

SALA-VILA, A.; MILES, E. A.; CALDER, P. C. Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. **Clinical and Experimental Allergy**, v.38, p.1432-1450, 2008.

SCHMITZ, P. G. *et al.* Glomerular hemodynamic effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.18, p.129-135, 1991.

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.560-569, suplement., 1999a.

_____. Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.60, n.5-6, p.421-429, 1999b.

_____. Omega-3 fatty acids and cancer. **Environment Indoor Built Environment**, v.12, p.405-412, 2003.

_____. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n.5, p.674-688, 2008.

SMITH, H. *et al.* The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man. **Journal Clinical Investigation**, v.24, p.388-404, 1945.

SMITH, W. L. Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. **Current Opinion in Cell Biology**, v.17, p.174-182, 2005.

TAKEUCHI, H. *et al.* The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.17, p.320-323, suplement. 1, 2008.

TAPIERO, H. *et al.* Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v.56, p.215-222, 2002.

- TERRY, P. *et al.* No association between fat and fatty acids intake and risk of colorectal cancer. **Cancer Epidemiological Biomarkers & Prevention**, v.10, p.913-914, 2001.
- THOMSEN, K.; SHIRLEY, D. G. The validity of lithium clearance as an index of sodium and water delivery from the proximal tubules. **Nephron**, v.77, p.125-138, 1997.
- THOMSEN, K; NIELSEN, C. B.; FLYVBJERG, A. Effects of glycine on glomerular filtration rate and segmental tubular handling of sodium in conscious rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.29, p.449-454, 2002.
- TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v.17, p.438-442, 2001.
- _____. Cancer cachexia. **Langenbeck's Archives of Surgery**. v.389, p.299-305, 2004.
- _____. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiology Review**, v.89, p.381-410, 2009.
- TOAL, J. N. *et al.* Sodium retention by rats bearing the Walker carcinosarcoma 256. **American Journal of Physiology**, v.200, p.175-181, 1961.
- USALAN, C.; EMRY, S. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with small cell lung carcinoma. **International Urology and Nephrology**, v.30, n.2, p.209-213, 1998.
- VALENTE GAMBA, C. *et al.* Effects of dietary lipids on renal function of aged rats. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.34, p.265-269, 2001.
- VAN ROSSUM, L. K. *et al.* Determination of inulin clearance by single injection or infusion in children. **Pediatric Nephrology**, v.20, p.777-781, 2005.
- VASKONEN, T. *et al.* Interrelationships between salt and fish oil in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Blood Press**, v.5, n.3, p.178-189, 1996.
- VISSCHER, C. A. *et al.* Drug-induced changes in renal hippurate clearance as a measure of renal blood flow. **Kidney International**, v.48, p.1617-1623, 1995.
- YANG, Y. J. Comparison of fatty acids profile in the serum of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Clinical Biochemistry**, v.32, p.405-409, 1999.
- WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v.4, n.4, p.475-478, 1958.
- WHITEHOUSE, A. S. *et al.* Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. **Cancer Research**, v.61, p.3604-3609, 2001.

ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



CERTIFICADO

N.º 243

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA N.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o confido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

APROVADO.

PROCESSO: 23075.022031/2007-28

RO 06/2007 - 31/07/2007

TÍTULO: Avaliação dos efeitos da suplementação crônica com óleo de peixe sobre a função renal de animais controle e caquéticos

AUTORES: Ricardo Fernandez Perez, Ana Lúcia Tararhuch, Fernando Augusto Malavazzi Casare, Luiz Cláudio Fernandes

DEPARTAMENTO: Fisiologia
Gurifiba, 09 de agosto de 2007.

Prof.ª Ana Maria Caliman Filadelfi
Coordenadora do CEEA