

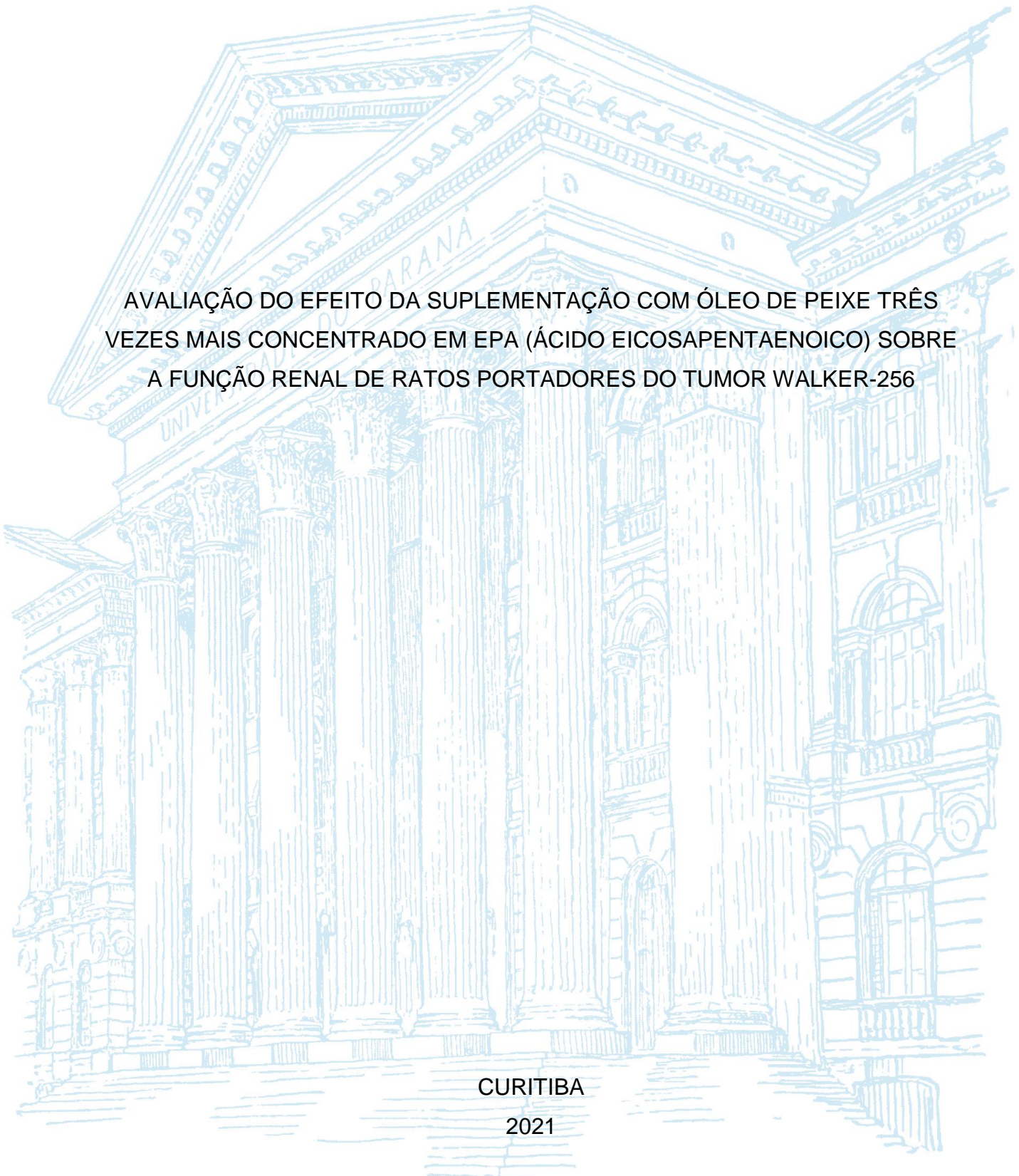
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SOFÍA TOMASELLI ARIONI

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE TRÊS VEZES MAIS CONCENTRADO EM EPA (ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO) SOBRE A FUNÇÃO RENAL DE RATOS PORTADORES DO TUMOR WALKER-256

CURITIBA

2021



SOFÍA TOMASELLI ARIONI

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE TRÊS
VEZES MAIS CONCENTRADO EM EPA (ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO) SOBRE
A FUNÇÃO RENAL DE RATOS PORTADORES DO TUMOR WALKER-256

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez

Coorientador: Prof. Dr. Luís Claudio Fernandes

CURITIBA

2021

Dedico este trabalho à minha abuela Alba Paladino (*in memoriam*) que foi um exemplo de mulher bondosa, forte e destemida. Ela me ensinou, inspirou e me fez muito feliz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de me graduar em Biomedicina. Às professoras Débora Rocio, Kátya Naliwaiko e Djanira Veronez que me acompanharam desde meu primeiro dia no setor de ciências biológicas e me inspiraram na jornada de estudos até me tornar uma biomédica pesquisadora. Ao meu professor Ricardo Fernandez Perez, que passou os dois últimos anos me ensinando e orientando no laboratório de fisiologia renal da UFPR. Aos professores do departamento Fabíola Iaguer, Luiz Claudio por terem me auxiliado na pesquisa ao longo dos anos de IC. Agradeço pelos amigos que fiz nos quatro anos de curso, pelas filas do RU, festas e desesperos pré provas que passamos juntos.

Por último, agradeço aos meus pais Dolores Tomaselli e Alvaro Arioni, que sempre me incentivaram a seguir meus sonhos e me mostraram que, como na epígrafe deste trabalho, na vida não há nada a se temer, apenas a ser compreendido.

“Na vida não há nada a se temer, apenas a ser compreendido”. (Marie Curie,
*1867/ †1934)

RESUMO

O ácido eicosapentaenoico (EPA) pertence à família dos ácidos graxos de cadeia longa n-3. No organismo o EPA compete com o ácido araquidônico (AA) pela via de metabolização formando moléculas de ação anti-inflamatória ou com pouca ação biológica. O câncer é um problema de saúde em todos os países e leva à caquexia, uma síndrome metabólica multifatorial em 50% dos casos. A caquexia leva à inflamação sistêmica, perda de peso e disfunção renal. A suplementação com EPA pode ser uma alternativa para o tratamento da caquexia, pela ação anti-inflamatória. No presente trabalho ratos Wistar machos foram injetados de maneira subcutânea com 4×10^8 células do tumor Walker-256 no flanco direito e no dia seguinte, iniciou-se a suplementação com óleo de peixe contendo 540mg de EPA a uma dose de 1g/kg/dia, por 14 dias (uma concentração de EPA 3x superior à habitual). Ao final do experimento os animais foram alocados individualmente em gaiolas metabólicas para mensuração da diurese e quantidades de comida e água consumidas em 24h. Os resultados mostram que apesar dos animais não terem desenvolvido caquexia apresentaram lesão renal, provavelmente na barreira de filtração glomerular, com proteinúria significativa nos grupos tumor. A suplementação promoveu estatisticamente menor proteinúria no grupo tumor suplementado ($p < 0,05$) sendo protetiva para a barreira de filtração glomerular. A albuminúria, mostrou a mesma tendência, apesar de não mostrar a diferença estatística entre os grupos tumor suplementado e não suplementado. Não houve diferença significativa no ganho de peso dos animais, bem como nas quantidades de água e comida consumidas e também na diurese. A proteinemia também não apresentou diferença. Os triglicerídeos plasmáticos apresentaram tendência de diminuição no grupo controle suplementado e não apresentou diferença nos grupos tumor. O *clearance* de creatinina não apresentou diferença significativa entre os grupos, apesar de se observar uma tendência à diminuição no grupo tumor suplementado indicando alteração na função renal. A fração de excreção de sódio não apresentou diferença significativa entre os grupos, assim como as osmolaridades plasmáticas e urinárias, *clearance* osmolar e de água livre. Estes resultados mostram que os animais não desenvolveram caquexia, mas apresentaram alteração renal pelo aumento da excreção urinária de proteínas, e esta alteração foi diminuída pela suplementação com óleo três vezes mais concentrado em EPA.

Palavras-chave: EPA. Câncer. Caquexia. Disfunção Renal.

ABSTRACT

Eicosapentaenoic acid (EPA) belongs to the long chain fatty acid n-3 family. EPA competes with arachidonic acid (AA) in the metabolization pathway and leads to the formation of anti-inflammatory molecules or molecules with less biological activity. Cancer is a health issue in every country in the World and leads to cachexia in 50% of the cases. Cachexia causes systemic inflammation severe weight loss and kidney dysfunction. As EPA has anti-inflammatory characteristics, it may be a good treatment for cachexia. In the present work, male Wistar rats were injected subcutaneously with 10^8 Walker-256 tumor cells in the right flank. From the day of injection, the rats were supplemented with oil containing 540mg of EPA, at a dose of 1g/kg/day, for 14 days. At the end of the experiment, the rats were individually put into metabolic cages for the attainment of the urinary volume per 24h, also the food and water intake per day. The results obtained showed significant higher proteinuria in the tumor groups. Statistically higher proteinuria was observed the tumor non-supplemented group in comparison with the tumor supplemented ($p < 0,05$), showing that the supplementation may have protected the glomerular filtration barrier. Albuminuria showed the same tendency as the proteinuria. The sodium excretion fraction was similar between groups, as well as the plasma and urine osmolarity, the osmolar clearance and de free water clearance. These results reveal that although the animals were not cachectic, they had altered kidney function caused by the tumor, and the EPA supplementation lowered the proteinuria, protecting the kidney.

Keywords: EPA. Cancer. Cachexia. Kidney Dysfunction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA DOS AGPI DE 18 CARBONOS	19
FIGURA 2 – VIA DE DESSATURAÇÃO E ALONGAMENTO DOS AGPI	20
FIGURA 3 – RAZÃO DE CONSUMO ÔMEGA 6: ÔMEGA 3	21
FIGURA 4 – MECANISMOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DOS AGPI n-3	23
FIGURA 5 – AÇÃO DOS AGPI n-3 SOBRE A FUNÇÃO RENAL	26
FIGURA 6 – MECANISMOS DA CAQUEXIA	30
FIGURA 7 – CURVA DE GANHO DE PESO	39
FIGURA 8 – <i>CLEARANCE</i> DE CREATININA	43
FIGURA 9 – PROTEINÚRIA TOTAL EM 24H	44
FIGURA 10 – ALBUMINÚRIA ESTIMADA EM 24H	45
FIGURA 11 – FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE SÓDIO	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PESO CORPORAL E DO TUMOR.....	39
TABELA 2 – PARÂMETROS METABÓLICOS.....	40
TABELA 3 – PARÂMETROS PLASMÁTICOS	42
TABELA 4 – OSMOLARIDADE.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

20-HETE	- Ácido hidroxeicosatetreníco
ADH	-Hormônio anti-diurético
AGPI	- Ácidos Graxos Poli-insaturados
ALA	- Ácido α -linoleico
C H ₂ O	- <i>Clearence</i> de água livre
Ccr	- <i>Clearance</i> de creatinina (mL/min/Kg)
Cosm	- <i>Clearence</i> osmolar
COX	- Cicloxigenase
DHA	- Ácido decosaheptaenóico
EPA	- Ácido eicosapentaenóico
FE Na ⁺	- Fração de excreção de sódio
GLOBOCAN	-Global Cancer Statistics
GLUT1	- Transportador de glucose-1
IFN	- Interferon
IL	- Interleucina
LA	- Nome por extenso
LMF	- Fator mobilizador de lipídeos
LOX	- Lipoxigenase
LT	- Leucotrieno
Ma	- Peso do animal (kg)
NF κ B	- Fator nuclear kappa B
Pcr	- Concentração plasmática de creatinina (mg/dL)
PG	- Prostaglandina
PIF	- Fator indutor de proteólise
Pion	- Concentração plasmática de Na ⁺ (mEq/L)
PKR	- Proteína cinase dependente de RNA
Posm	- Osmolaridade plasmática (mOsm/L);
TNF α	- Fator de necrose tumoral alfa
TX	- Tromboxano
Ucr	- Concentração urinária de creatinina (mg/dL)
Uion	- Concentração urinária de Na ⁺ (mEq/L)
Uosm	- Osmolaridade da urina (mOsm/L)

Vu - Volume urinário (mL/min)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	17
1.2 HIPÓTESE	17
1.3 OBJETIVOS	17
1.3.1 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 MECANISMOS DE AÇÃO DOS AGPI.....	21
2.1.1 AGPIs e o Processo Inflamatório	21
2.2 FUNÇÃO RENAL E AGPI	23
2.3 CÂNCER E CAQUEXIA	27
2.3.1 Mediadores da Caquexia.....	28
2.3.2 Câncer e Função renal.....	31
2.3.3 Caquexia e AGPI n-3.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
3.2 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR	34
3.3 PARÂMETROS METABÓLICOS	34
3.4 EUTANÁSIA	34
3.5 FILTRAÇÃO GLOMERULAR (<i>CLEARANCE</i> DE CRESTININA)	35
3.6 EXCREÇÃO URINÁRIA DE PROTEÍNAS TOTAIS E ALBUMINA	35
3.7 TRIGLICERÍDOS	36
3.8 MANEJO RENAL DE SÓDIO.....	36
3.9 OSMOLARIDADE	36
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 O MODELO	38
4.2 INGESTA DE ÁGUA E ALIMENTO.....	40
4.3 PARÂMETROS PLASMÁTICOS	40
4.4 FUNÇÃO RENAL	42
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A partir do início do século XX, a população ocidental mudou o padrão alimentar diminuindo o consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPIs n-3) e aumentando o consumo de AGPIs n-6 (SIMOPOULOS, 2011). Este desequilíbrio na dieta, juntamente com o sedentarismo e outros hábitos de vida relacionados à urbanização, levou a elevação da incidência de doenças como hipertensão, diabetes e câncer que já se encontram entre as principais causas de morte prematura no mundo (BRAY et al., 2018). Uma das consequências do câncer é a caquexia, uma síndrome metabólica multifatorial que atinge cerca de metade dos pacientes oncológicos. Esta síndrome leva à inflamação sistêmica, perda de peso progressiva e disfunção renal (ARGILÉS et al., 2014).

Os principais ácidos graxos de cadeia longa ômega-3 (AGPIs n-3) são o Ácido Eicosapentaenóico (EPA) e o Ácido Docosahexanóico (DHA), derivados do Ácido Alfa-Linolênico (ALA) (CALDER, 2012). Os AGPI n-3 devem ser obtidos da alimentação, sendo o ALA encontrado em sementes de chia e folhas verdes e o EPA e o DHA encontrados principalmente nos peixes de águas frias como atum. Já o principal AGPI n-6 é o Ácido Araquidônico (AA), derivado do Ácido Linoleico (LA). Estes são abundantes nos óleos de milho e soja. Além disso, o AA é encontrado principalmente na carne de animais e nos ovos (KAUR; CHUGH; GUPTA, 2014). No organismo os AGPIs n-3 competem com os AGPIs n-6 pelas vias de metabolização ciclooxigenase (COX), lipoxigenase (LOX) e citocromo P450. Enquanto os produtos da metabolização do AA são pró-inflamatórios como a prostaglandina E₂ e tromboxano A₂, o metabolismo do EPA e DHA leva a produção de mediadores anti-inflamatórios (como a prostaglandina I₃) ou com pouca ação biológica, além de promover a diminuição da transcrição de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6) (CALDER, 2013).

Os mecanismos anti-inflamatórios dos AGPI n-3 estão associados a um menor crescimento tumoral e a melhora em relação aos efeitos da caquexia, diminuindo a perda de peso, a degradação proteica e lipídica, aumentando o fluxo sanguíneo renal e melhorando o padrão de excreção de sódio pelos rins (COELHO; FERNANDEZ, 2012).

1.1 JUSTIFICATIVA

A incidência de câncer aumenta a cada ano, e já é uma das doenças que mais matam no mundo (BRAY et al., 2018). A caquexia aparece em cerca de 50% dos casos de câncer levando a morte de 20% dos pacientes. Não está relacionada ao tamanho do tumor podendo aparecer em tumores com 0,01% do peso corporal do portador (ARGILÉS et al., 2014). Além disso, o estado debilitado do paciente causado pela caquexia dificulta o tratamento do tumor. O melhor tratamento para esta condição seria a cura do câncer, no entanto isto nem sempre é atingido em adultos com tumores sólidos em estágio avançado. Portanto, encontrar meios para melhorar a qualidade de vida dos pacientes é essencial (GORJAO et al., 2019).

Um destes meios é a suplementação com EPA, que vem mostrando benefícios sobre a caquexia e o câncer em diversos estudos (BOROW; MASON; VIJAYARAGHAVAN, 2017). Apesar disto, ainda não existe consenso sobre a utilização dos AGPIs n-3 no tratamento do câncer, se fazendo necessária a realização de estudos pré-clínicos que avaliem os efeitos do consumo de fórmulas concentradas em EPA e DHA (GORJAO et al., 2019).

1.2 HIPÓTESE

Esperou-se encontrar a partir da suplementação, de maneira aguda, com óleo de peixe três vezes mais concentrado em EPA que nas formulações normalmente utilizadas, uma redução dos parâmetros metabólicos e renais relacionados à caquexia, resultando em uma menor perda de peso pelos animais, maior ingestão de comida, melhora na filtração glomerular e menor proteinúria.

1.3 OBJETIVOS

Investigar os efeitos da suplementação com óleo de peixe três vezes mais concentrado em EPA, sobre a função renal e parâmetros metabólicos relacionados à presença do tumor Walker-256 e à caquexia.

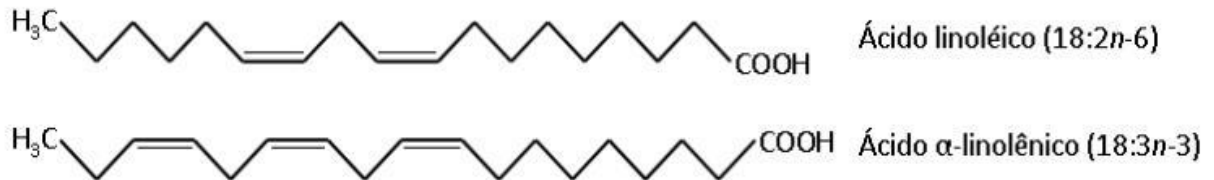
1.3.1 Objetivos específicos

- Induzir o modelo de caquexia nos animais a partir da inoculação do tumor Walker-256;
- Comparar crescimento tumoral entre os animais suplementados com EPA e os controle;
- Avaliar parâmetros de função renal: filtração glomerular, excreção urinária de proteínas, fração de excreção de sódio e *clearance* osmolar e de água livre;
- Avaliar parâmetros metabólicos: curva de ganho de peso; ingestão de água e comida;
- Avaliar parâmetros plasmáticos: concentração de triglicerídeos, Na⁺ e proteínas no plasma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são considerados essenciais pois não podem ser sintetizados no corpo humano e precisam ser adquiridos através da dieta (SIMOPOULOS, 2011). Os AGPI têm de 18 a 22 carbonos e duas ou mais insaturações C=C. São estruturalmente conhecidos como ômega 3, ou *n*-3 e ômega 6, ou *n*-6 (RUXTON et al., 2004), sendo esta nomenclatura definida pela primeira insaturação contada a partir do terminal metil da molécula (FIGURA 1) (CALDER, 2013).

FIGURA 1 – ESTRUTURA DOS AGPI DE 18 CARBONOS



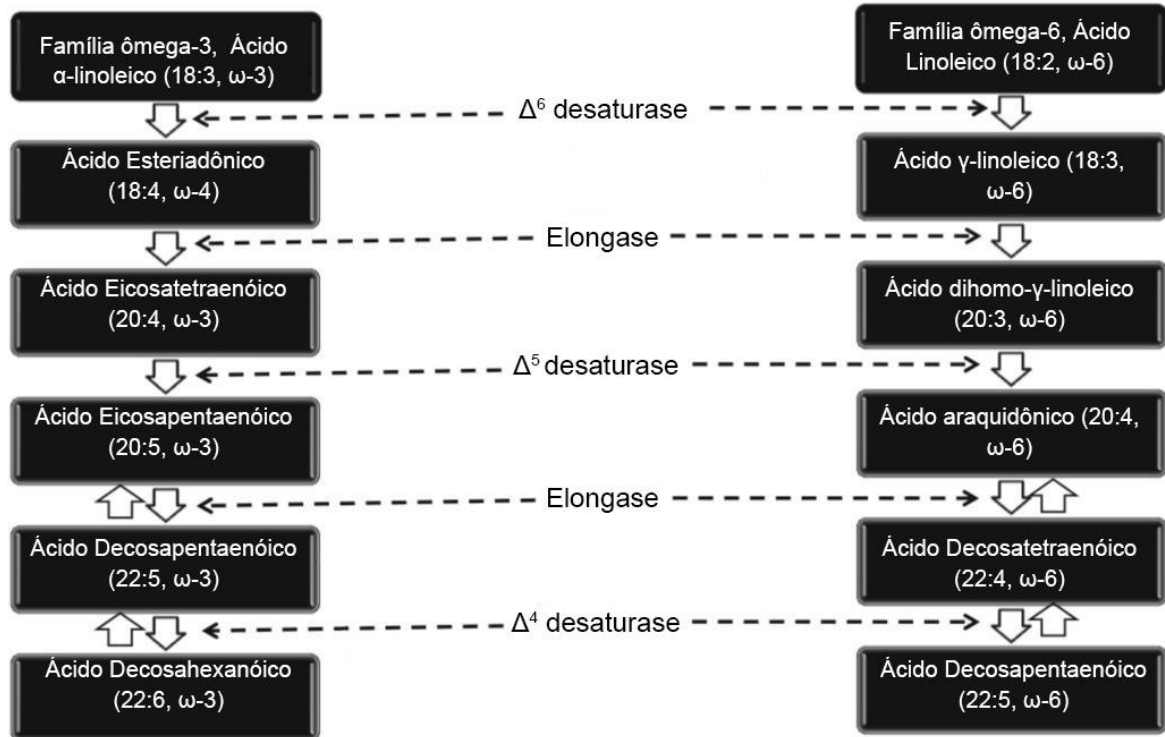
Estrutura química dos Ácidos linoleico e α -linoleico, demonstrando a posição das insaturações. FONTE: Adaptado de Coelho 2011.

O AGPI *n*-3 mais simples é o Ácido α -linolênico (ALA), que é precursor dos Ácidos Eicosapentaenóico (EPA) e Decosahexanóico (DHA). O ALA é formado a partir do Ácido Linoleico (LA) pela enzima Δ 15-desaturase, que existe apenas nas plantas. O Ácido Linoleico (LA) é o mais simples AGPI *n*-6, e é precursor do Ácido Araquidônico (AA) (CALDER, 2013). Particularmente no fígado, o ALA e o LA formam os referidos produtos a partir de uma via compartilhada de dessaturação e alongamento, na qual competem pela enzima Δ 6-desaturase (FIGURA 2) (LI et al., 2015). Esta enzima tem mais afinidade pelo ALA, no entanto como a dieta ocidental atual é mais rica em LA, a formação de AA se torna quantitativamente importante, tornando necessário o consumo de EPA e DHA a partir de suas fontes alimentares (CALDER, 2013).

O ALA é abundante no óleo de linhaça, e em menor quantidade no óleo de canola e soja. Também é encontrado nos cloroplastos dos vegetais de folhas verdes. O LA é encontrado no cártamo, no óleo de girassol, no óleo de soja e no milho. Já a principal fonte de EPA e DHA são os peixes, frutos do mar e óleo de

peixe. O AA é obtido através do consumo de carne bovina, aves, ovos e laticínios (RUXTON et al., 2004).

FIGURA 2 – VIA DE DESSATURAÇÃO E ALONGAMENTO DOS AGPI



Via compartilhada pelo ALA e LA, demonstrando a competição pela enzima Δ -6 desaturase, fator limitante do processo. FONTE: Kaur (2014).

A dieta humana evoluiu desde o período paleolítico principalmente na quantidade e no tipo de ácidos graxos, assim como no conteúdo de antioxidantes presentes nos alimentos. Porém, as maiores mudanças ocorreram a partir da revolução industrial, no último século. Houve um aumento na ingestão de energia, no consumo de gordura saturada, gordura *trans* e AGPI n-6, enquanto o consumo de AGPI n-3 diminuiu (SIMOPOULOS, 2011). Foi demonstrado que a razão de consumo de ômega 6 em relação ao omgea-3 cresceu de 1:1, razão encontrada nos animais selvagens e, possivelmente nos humanos do paleolítico, para 30:1 na dieta ocidental atual. Este aumento na ingestão de ômega-6 é devido ao consumo de óleo de soja, girassol e milho. Por isso, estima-se que a população atual seja deficiente em ômega-3 (BLASBALG et al., 2011; SIMOPOULOS, 2011).

FIGURA 3 – RAZÃO DE CONSUMO ÔMEGA 6: ÔMEGA 3

Razão entre Ácidos Graxos Ômega-6:Ômega-3 na Dieta Paleolítica e na Dieta Ocidental Atual (nos Estados Unidos)^a

	Paleolítica	Ocidental
LA:ALA	0.70	18.75
AA+DTA:EPA+DPA+DHA	1.79	3.33
Total	0.79	16.74

^aLA, ácido linoleico; ALA, ácido alfa linoleico; AA, ácido araquidônico; EPA, ácido eicosapentaenoico ; DTA, ácido decosatetraenóico; DPA, decosapentaenóico; DHA, decosaheptaenóico.

Razão de consumo ômega-6:ômega3 na dieta paleolítica e na dieta ocidental atual, demonstrando o aumento expressivo de consumo de AGPIs n-6. Fonte: Simopoulos, 2011.

2.1 MECANISMOS DE AÇÃO DOS AGPI

Os AGPI n-3 participam de diversos processos fisiológicos. Atuam na formação dos fosfolípidios das membranas biológicas (LI et al., 2015), mediando a permeabilidade de íons, a ação de hormônios e proteínas sinalizadoras (CALDER, 2012). Agem na regulação da pressão arterial, na tolerância a glucose na concentração plasmática de lipídeos, principalmente triglicérides (RUXTON et al., 2004) e são importantes para o desenvolvimento e função do sistema nervoso (CALDER, 2012). Ainda, possuem atividade anti-inflamatória e pró-resolutiva da inflamação (CALDER, 2013).

2.1.1 AGPIs e o Processo Inflamatório

Quando incorporados aos fosfolípidios de membrana, o EPA e o DHA atuam como substratos alternativos ao AA para as enzimas cicloxigenase (COX), lipoxigenase (LOX) e citocromo P450. Estas enzimas metabolizam lipídeos de 20 carbonos, formando os eicosanoides prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. (CALDER, 2012, 2013). O AA é o AGPI mais encontrado nos fosfolípidios de membrana de macrófagos, neutrófilos e linfócitos. A enzima fosfolipase A2, ativada

pelo estímulo inflamatório, libera o AA para o citosol, tornando-o substrato para COX, formando prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX), para LOX formando leucotrienos (LT) e para o citocromo P450 formando Ácido Hidroxieicosatetraenóico e Ácido Epoxieicosatrienóico (CALDER, 2013).

Quando o AA é o substrato para as enzimas do processo inflamatório COX e LOX, a reação produz eicosanoides de potente ação pró-inflamatória como a PGE2 e o LTBE4. Já quando EPA e DHA são os substratos, a reação forma eicosanoides de estrutura diferente e menor ação biológica como a PGE3 e o LTBE5 (CALDER, 2007). A razão para a menor ação biológica dos mediadores derivados de EPA e DHA é a menor afinidade dos receptores de eicosanoides em comparação com os mediadores derivados de AA (WADA et al., 2007).

Além disso, o EPA e o DHA aumentam a produção de resolvinas e protectinas, moléculas de ação anti-inflamatória e pró-resolutiva da inflamação. As resolvinas E1 e D1 e protectina D1, derivadas de EPA e DHA, inibem a migração transendotelial de neutrófilos, prevenindo a infiltração destas células em locais com inflamação (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008).

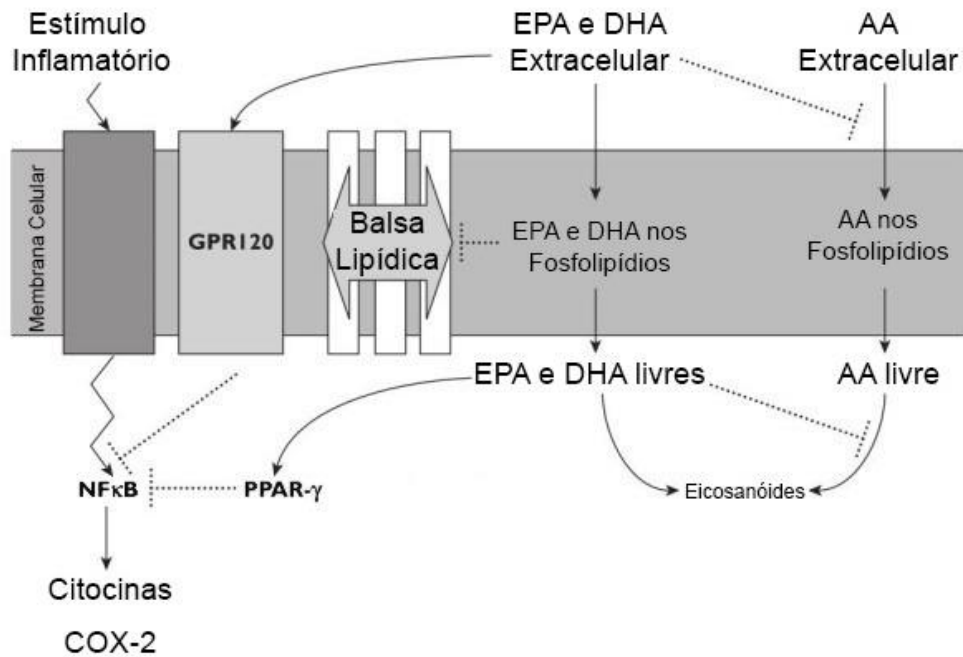
O EPA e o DHA também inibem a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e COX-2 por diminuir a atividade do Fator Nuclear Kappa B (NFκB), um dos fatores de transcrição mais importantes para o processo inflamatório (ZHAO et al., 2004). O NFκB é ativado pela auto fosforilação do IκB, a subunidade inibitória deste fator de transcrição. O EPA e o DHA promovem a manutenção dos níveis de IκB no citosol, assim não ativando a via do NFκB (OH et al., 2010).

AGPIs n-3 agem promovendo ativação do receptor de proliferação de peroxissomos PPAR-γ. Este receptor tem propriedades anti-inflamatórias interferindo na translocação do NFκB para o núcleo, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (PHILIP C. CALDER, 2020). O EPA e o DHA também se ligam na proteína de membrana G 120 (GPR120), cuja ativação também promove manutenção dos níveis de IκB citosólico e diminuição de TNF-α e IL-6 (OH et al., 2010).

Por último, a composição dos fosfolípidos de membrana influencia na formação das balsas lipídicas (*lipid rafts*), domínios ricos em colesterol que se formam a partir do movimento de receptores, proteínas acessórias e enzimas na superfície da célula (PHILIP C. CALDER, 2020; VARSHNEY; YADAV; SAINI, 2016). Este movimento acontece em resposta a ativação celular e está intimamente

relacionado a ativação dos linfócitos T. A exposição destas células aos AGPI n-3 altera a formação das balsas lipídicas, impedindo a sinalização intracelular, resultando em uma menor ativação (CALDER, 2013). Todos estes mecanismos estão resumidos na Figura 4.

FIGURA 4 – MECANISMOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DOS AGPI n-3



A figura resume os mecanismos pelos quais os AGPI n-3 agem de maneira anti-inflamatória. As setas diretas indicam ativação e as setas truncadas indicam inibição. Fonte: Calder (2013).

2.2 FUNÇÃO RENAL E AGPI

A inflamação é o fator causador de doenças renais (JIA et al., 2015). As PGs são responsáveis por regular o processo inflamatório no rim, onde e são abundantemente produzidas, contribuindo para a ocorrência e progressão de doenças renais (LI et al., 2018). Além disso, PGs participam da regulação da resistência arteriolar no glomérulo renal, da homeostase de sal e água e medeiam a ação de hormônios (KIM, 2008).

No tecido renal, a principal enzima metabolizadora do AA é a COX (HARRIS; ZHANG, 2011). Como já comentado na subseção 2.1.1, o AA é liberado para o

citoplasma da célula pela fosfolipase A2 e então metabolizado em PGs incluindo PGE2, PGI2, PGD2, PGF2 α e TXs como o TXA2 e TXA3 (HAO; BREYER, 2007).

A COX é a enzima limitante no processo de síntese das PGs, apresentando-se em duas isoformas: COX-1 e COX-2 (LI et al., 2018). A COX-1 é expressa constitutivamente em diversos tecidos em condições basais e tem uma ação *housekeeping* ou de organização interna (WARFORD-WOOLGAR et al., 2006). No rim, a COX-1 é altamente expressa no ducto coletor, e em menor quantidade nas células intersticiais, mesangiais, e endoteliais das arteríolas (NØRREGAARD; KWON; FRØKIÆR, 2015). Já COX-2 pode ser induzida pelo estímulo inflamatório, mediando a expressão de diversas PGs que participam de processos como a angiogênese, a inflamação e a tumorigênese (LI et al., 2018). Entretanto, no rim a COX-2 também tem uma ação de organização interna (FANG et al., 2013), sendo predominantemente expressa na macula densa, na alça ascendente espessa, nas células intersticiais medulares e no glomérulo (NØRREGAARD; KWON; FRØKIÆR, 2015). A partir da distribuição no rim, a COX-2 participa ativamente da regulação da excreção de renina e metabolismo de sal e água (LI et al., 2018).

Os prostanóides mais expressos no tecido renal são a PGE2 e o TXA2, metabólitos do AA, que atuam ligando-se aos seus receptores acoplados a proteína G EP1, EP2, EP3, EP4 e TP, respectivamente (HARRIS; ZHANG, 2011). Os receptores EP1 e EP3 são expressos predominantemente na alça ascendente espessa e no ducto coletor e quando estimulados, reduzem a absorção de água e Na⁺ promovendo natriurese e diurese. O receptor EP4 é expresso no glomérulo, regulando a hemodinâmica glomerular e a secreção de renina. Já o receptor TP, também expresso no glomérulo, quando estimulado aumenta a resistência glomerular (HAO; BREYER, 2007).

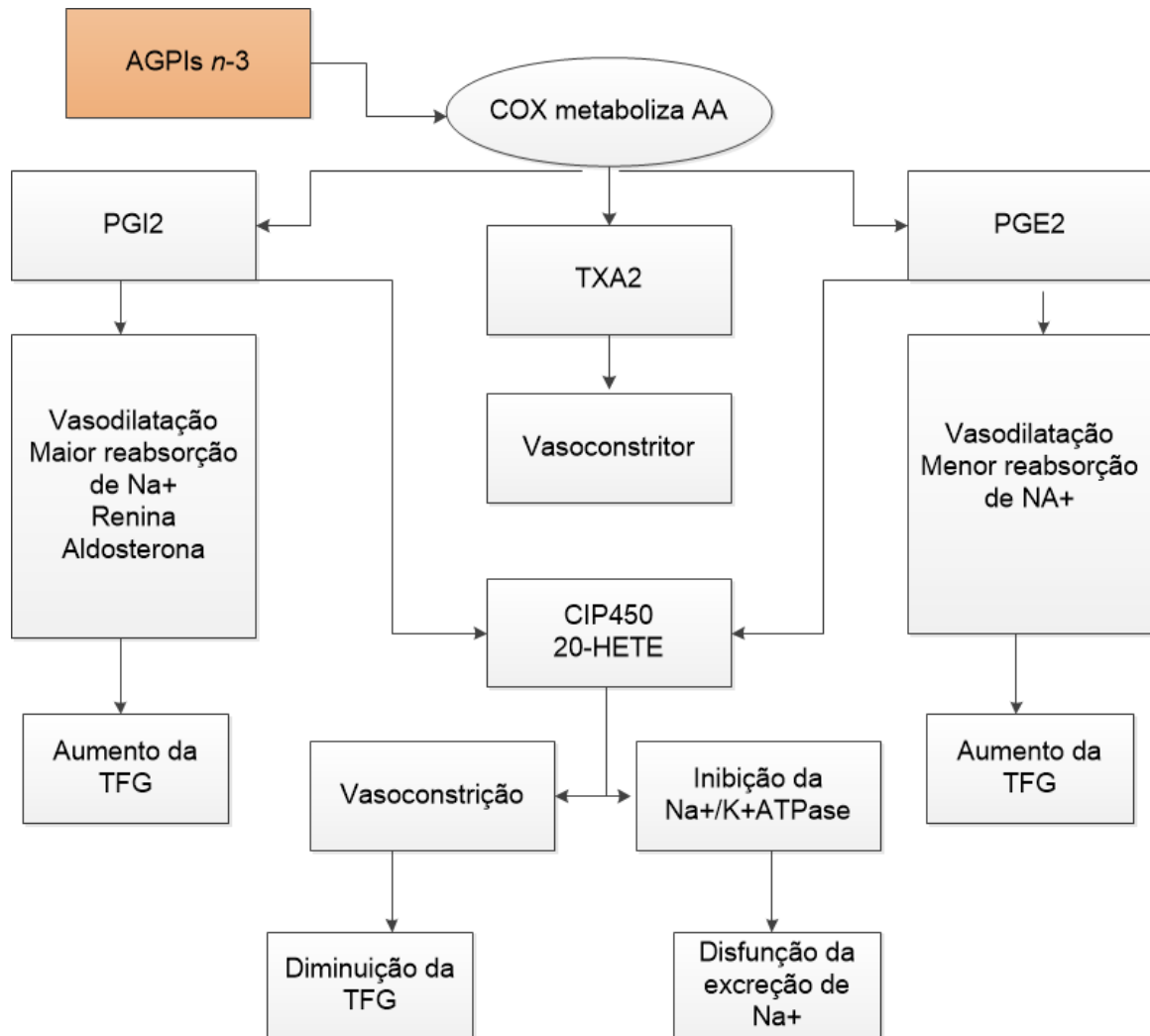
A PGE2 e a prostaciclina (PGI2) tem ação vasodilatadora, provocando aumento do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular, enquanto o TXA2 é um potente vasoconstritor. Além disso, a PGE2 também está envolvida no manejo renal de água e sódio, atuando na diminuição da reabsorção de Na⁺ na parte ascendente espessa da alça de Henle. A ação de PGE2 estimula a secreção de renina, que leva a secreção de aldosterona aumentando a reabsorção de sódio e a secreção de potássio no néfron distal (HARRIS; ZHANG, 2011).

A PGE2 tem papel protetivo sobre o rim, no entanto, pode juntamente com o AA sofrer hidroxilação via citocromo P450 formando derivados como o ácido 20-

hidroxieicosatetrenóico (20-HETE), potente vasoconstritor e inibidor da Na^+/K^+ ATPase tubular (LASKER et al., 2000).

Embora os metabólitos do AA não atuem fortemente sobre a homeostase renal em um estado saudável, em condições patológicas se tornam importantes (WANG et al., 2019). Em condições como dano glomerular, nefropatia diabética, insuficiências renais agudas ou crônicas, nefropatia por IgA e hipertensão essencial, foi observado a relação dos prostanóides derivados de AA nas mudanças da função renal causadas por estas patologias (HAO; BREYER, 2008, 2007). Já a ingestão de uma dieta rica e AGPI n-3 provoca competição pela via metabólica da cicloxigenase, como já comentado na subseção 2.1.1, resultando na produção de moléculas com pouca ação biológica e na diminuição da produção de moléculas vasoconstritoras. Logo, a suplementação com AGPIs tem sido utilizada no tratamento de patologias renais em que os metabolitos do AA estão envolvidos. Na maioria dos casos foi observada redução significativa na evolução das doenças (HAO; BREYER, 2008, 2007).

FIGURA 5 – AÇÃO DOS AGPI n-3 SOBRE A FUNÇÃO RENAL



A figura mostra o efeito antagônico sobre a função renal da PGI₂ e da PGE₂ em relação ao TXA₂. Enquanto PGI₂ e PGE₂ são prostaglandinas vasodiladoras, levam a maior reabsorção de Na⁺ e ao aumento da taxa de filtração glomerular (TFG), o TXA₂ é vasoconstritor. As setas apontando para o centro mostram a PGI₂ e a PGE₂ sofrendo metabolização via CIP450 em 20-HETE, potente vasoconstritor, levando a diminuição da TFG e inibidor da Na⁺ / K⁺ ATPase, levando a disfunção na excreção de Na⁺. Já o quadro laranja no canto superior direito da figura mostra os AGPI n-3 competindo com o AA pela ação da COX, levando a formação de metabólitos com menor ação biológica. FONTE: o autor (2021).

2.3 CÂNCER E CAQUEXIA

Câncer é um Grupo de mais de 400 diagnósticos histológicos. É causado por um conjunto de fatores tanto externos, como tabagismo, exposição a produtos químicos, a radiação ionizante e infecções, como internos: mutações genéticas, hormônios e alterações metabólicas (TISDALE, 2009, 2010). Dentre estes fatores, as mutações gênicas determinam os indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento da doença, já os fatores ambientais, como sedentarismo e alimentação inadequada determinam quais indivíduos susceptíveis serão afetados. Dentre estes fatores, a nutrição é o mais importante (AOYAGI et al., 2015; ARGILÉS et al., 2014).

O câncer é um dos problemas de saúde mais importantes no mundo, estando na maioria dos países entre as quatro principais causas de morte antes dos 70 anos de idade. A incidência de morte por câncer aumenta a cada ano tanto pelo envelhecimento da população, quanto pela mudança na prevalência dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento socioeconômico. Nos países em desenvolvimento, caiu a incidência de canceres relacionados a infecções e aumentou a incidência de canceres relacionados à incorporação de hábitos associados à urbanização, como o sedentarismo e a má alimentação ((INCA), 2020)

O mais recente GLOBOCAN (Global Cancer Statistics), no ano de 2018, mostrou a ocorrência de 18 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de óbitos. Nos países com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) mais alto as taxas de incidência foram duas a três vezes maiores do que nos países com baixo IDH (BRAY et al., 2018). No Brasil, a estimativa para os anos de 2020, 2021 e 2022 é de que ocorram 625 mil novos casos de câncer. A região Sudeste concentra 60% dos casos, seguida pela região Nordeste, com 27,8% e a região Sul, com 23,5% ((INCA), 2020).

Etimologicamente, a palavra caquexia provém do grego *kakos hexis*, que significa “condição ruim”. Atualmente, o consenso sobre esta patologia é de que seja uma síndrome multifatorial que envolve mudanças em diversas vias metabólicas, de vários tecidos e órgãos (ARGILÉS et al., 2014). A caquexia é associada a doenças pré-existentes, aparecendo junto a patologias como a síndrome da imunodeficiência adquirida, doença pulmonar obstrutiva crônica, esclerose múltipla, falência cardíaca crônica, tuberculose, envenenamento por mercúrio (acrodinia) e, principalmente, o câncer (AOYAGI et al., 2015).

A caquexia é indiretamente responsável pela morte de cerca de 20% dos pacientes com câncer. A incidência varia de acordo com o tipo de tumor. A maior incidência está nos tumores gástricos e pancreáticos, aparecendo em 80% dos pacientes. Para tumores de pulmão, cólon e reto e próstata, a incidência é de aproximadamente 50%, já para tumores de mama, e algumas leucemias a incidência é de 40% (ARGILÉS et al., 2014).

O aparecimento da síndrome não está relacionado diretamente com o tamanho do tumor, nem com a presença de metástases, podendo aparecer em pacientes cujo tumor representa 0,01% do peso corporal (PIZATO et al., 2006; TISDALE, 2005), mas depende do sítio do tumor, sendo mais frequente em pacientes com câncer de pulmão e cânceres gastrointestinais. (TISDALE, 2010). A condição debilitada do paciente caquético também dificulta o tratamento oncológico, seja cirúrgico, quimioterápico ou radioterápico (ARGILÉS et al., 2014; TISDALE, 2009).

2.3.1 Mediadores da Caquexia

A caquexia é caracterizada por inflamação sistêmica, perda de peso progressiva e depleção de tecido adiposo e muscular esquelético que não pode ser totalmente revertida com suporte nutricional comum. (FEARON et al., 2011; PEIXOTO DA SILVA et al., 2020). Além disso, na caquexia há resistência a sinais anabólicos, um intenso estado catabólico e balanço energético negativo (PORPORATO, 2016), juntamente a isso podem ocorrer anorexia, sarcopenia, anemia e resistência insulínica (ARGILÉS et al., 2014; BRUERA; SWEENEY, 2000; EVANS et al., 2008). Outras disfunções relacionadas a caquexia são disfunção imune (FEARON et al., 2011), disfunção hormonal (WHITE et al., 2013), cardíaca (SILVA et al., 2014) e renal (FERNANDEZ et al., 2004).

Células cancerosas tem um numero limitado de mitocôndrias e muitas vezes dependem da glicólise ao invés da fosforilação oxidativa para produção de energia (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011). Com alta demanda por energia, essas células super-expressam o transportador de glucose-1 (GLUT-1) que mantém o nível de glucose alto nas células (WOOD; TRAYHURN, 2003) e também regula vias de sinalização de câncer de mama (OH et al., 2017).

A caquexia também causa perda da gordura corporal pelo aumento da lipólise nos adipócitos (AGUSTSSON et al., 2007). Este processo está associado a ativação da lipase-hormônio sensível (HSL) e também a mobilização do fator mobilizador de lipídios (LMP) (ARGILÉS et al., 2005, 2014; GORJAO et al., 2019). Além disso, na caquexia humana há uma diminuição do efeito anti-lipolítico da insulina e um aumento da resposta à catecolaminas e ao peptídeo natriurético atrial, que estimulam a lipólise (ARGILÉS et al., 2005). Por último, a taxa de lipogênese *de novo* é diminuída, resultando em adipócitos de menor volume (ARGILÉS et al., 2005; INACIO PINTO et al., 2015).

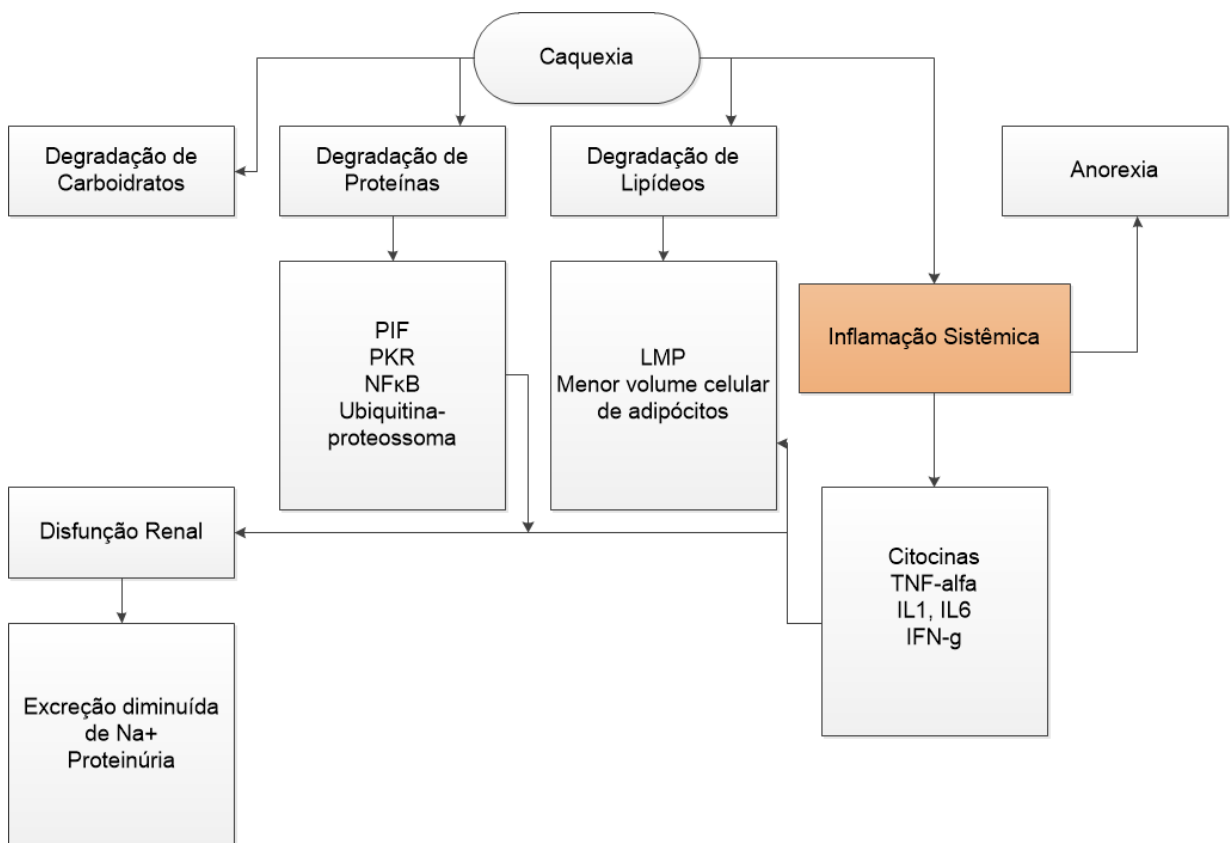
Outro fator chave no desenvolvimento da caquexia é a perda das proteínas das células musculares, resultando em fraqueza muscular e fadiga (ARGILÉS et al., 2014). Isto é devido à diminuição da síntese e ao aumento da degradação proteica (ELEY; TISDALE, 2007). Um mediador importante deste processo é o fator indutor de proteólise (PIF) produzido pelo tumor, que promove autofosforilação da proteína quinase dependente de RNA (PKR). A PKR inibe o início da síntese proteica induzindo fosforilação do fator de iniciação 2 (TISDALE, 2010). Ainda, a PKR ativa o NFκB levando ao aumento da expressão e atividade da via de degradação proteica ubiquitina-proteossoma, considerada a principal via de degradação proteica da caquexia (ARGILÉS et al., 2014). No entanto, a degradação de proteínas miofibrilares intactas parece acontecer por clivagem calpaína dependente e posterior ubiquitinação e degradação proteossoma dependente dos miofilamentos (SMITH et al., 2011). A apoptose e a autofagia também contribuem para o processo de perda muscular (ARGILÉS et al., 2014; TARDIF et al., 2013).

Vários mediadores inflamatórios estão relacionados com o processo de perda muscular na caquexia (ZHOU et al., 2010). Dentre estes, TNF-α, IL-6, IL-1β e IFN-γ estão associados com a ativação da degradação proteica e inibição da síntese proteica no tecido muscular (ARGILÉS et al., 2009). Estas citocinas, junto à prostaglandina E2 também participam da patogênese no tecido adiposo (FIGURA 6) (WANKHADE et al., 2016).

Os mediadores pró-inflamatórios atravessam a barreira hematoencefálica e agem no cérebro promovendo o estado caquético e inibindo o apetite levando à anorexia tanto em ratos como em pacientes (FIGURA 6) (GROSSBERG; SCARLETT; MARKS, 2010). O TNF-α promove maior concentração de triptofano no plasma, aumentando os níveis de serotonina no hipotálamo, o que leva a saciedade

rapidamente (GORJAO et al., 2019). Além disso, os hormônios catabólicos cortisol e adrenalina são encontrados em altas concentrações em animais e pacientes caquéticos, enquanto a insulina, hormônio anabólico está diminuída (DE CASTRO, 2014).

FIGURA 6 – MECANISMOS DA CAQUEXIA



O fluxograma acima resume os mecanismos pelos quais a caquexia do câncer ocorre. Do balão acima saem 4 flechas, representando as quatro características da síndrome: degradação de carboidratos, proteínas e lipídios e inflamação sistêmica, no quadrado em laranja. Deste quadrado parte uma flecha que indica ação da inflamação sobre o sistema nervoso central, levando à anorexia, e outra flecha demonstrando as principais citocinas envolvidas na caquexia: TNF- α , IL1, IL6 e IFN- γ . Estas agem sobre o PIF e o LMP, representados à esquerda e também sobre a função renal levando à retenção de sódio e proteinúria. FONTE: O autor (2021).

2.3.2 Câncer e Função renal

A ocorrência de síndrome nefrótica associada a doenças malignas é um fenômeno conhecido (USALAN; EMRI, 1998). A síndrome nefrótica associada ao câncer é chamada de síndrome paraneoplásica, pois não está diretamente relacionada ao tumor ou às metástases, mas sim, como a caquexia, às moléculas secretadas pelo tumor como as citocinas, fatores de crescimento e antígenos tumorais (CAMBIER; RONCO, 2012). Os sintomas associados são edema, albuminúria intensa, hipoalbuminemia e hiperlipidemia (YU et al., 2020).

Além disso, a caquexia leva a retenção de sódio e água tanto em humanos quanto em ratos portadores do tumor Walker-256. Em animais, este efeito é considerado uma consequência tardia do desenvolvimento tumor. A retenção de Na^+ também está relacionada às moléculas secretadas pelo tumor, assim como prostaglandinas, renina e o hormônio anti-diurético (ADH) (RETTORI; VIEIRA-MATOS; GONTIJO, 2000).

2.3.3 Caquexia e AGPI n-3

Os AGPI n-3 já mostraram reduzir os efeitos da caquexia e também do crescimento tumoral (GORJAO et al., 2019). O principal mecanismo pelo os AGPI-n3 agem sobre a caquexia é pela competição com o AA pela via metabólica, como já discutido na sessão 2.1. O EPA e do DHA possuem efeito anti-inflamatório e alteram diversas vias de transdução de sinal (CALDER, 2012, 2013). Como discutido na subseção 2.3.1, os AGPI n-3 levam a inibição da transcrição de NF κ B, inibindo assim a transcrição de TNF- α , IL-1 e IL-6. Esta regulação é um efeito anti-caquético importante do EPA (GORJAO et al., 2019).

Na degradação proteica induzida pela caquexia, o EPA age atenuando a atividade de vias catabólicas induzidas pelo PIF. Dentre estas, o EPA diminui a ação da via proteolítica ATP ubiquitina dependente (WHITEHOUSE et al., 2001). A via ubiquitina-proteossoma é supra-regulada pelo NF κ B e o EPA diminui a migração nuclear deste fator, reduzindo a degradação dos miofilamentos induzida pelo PIF (WHITEHOUSE; TISDALE, 2003). O EPA também inibe a necrose e apoptose no músculo esquelético por reduzir os níveis de TNF- α e outras citosinas envolvidas na apoptose (GORJAO et al., 2019).

O EPA suprime o crescimento tumoral por múltiplos mecanismos. A diminuição de IL-6 e TNF- α e ativação de fatores de transcrição Ras e Proteína ativadora 1 (AP-1) através da inibição da via MAP-cinase, agindo diretamente para diminuir a velocidade de crescimento das células tumorais (GORJAO et al., 2019). Os AGPI n-3 induzem diferenciação celular e diminuem a angiogênese tumoral e o aporte de nutrientes como gorduras saturadas, mono-insaturadas e n-6 pelo tumor, limitando o crescimento tumoral e preservando a reserva de gordura do hospedeiro. Isto aumenta a resposta do tumor aos tratamentos antineoplásicos tradicionais e diminui efeitos colaterais da quimioterapia (GORJAO et al., 2019; WANG et al., 2000).

Sobre o tecido renal, o trabalho de Coelho et al. (2012) mostrou que a suplementação com óleo de peixe contendo 180 g/Kg de EPA e 120 g/Kg de DHA aumentou o fluxo sanguíneo renal, promoveu menor proteinúria e diminuição da caquexia em animais portadores do tumor Walker-256. No estudo de Fernandes (2004), também foi observada atenuação das mudanças na excreção renal de sódio, e aumento da taxa de filtração glomerular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus) com 90 dias, obtidos através do biotério do Setor de Ciências Biológicas. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas, com cicloclaro/escuro (12/12 horas), temperatura controlada em $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e água e alimentação *ad libitum*. A ração foi composta por 66% de carboidratos, 23% de proteínas, 4% de lipídios, 6% de fibras e 1% de vitaminas e minerais (Nuvilab AR/ Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba, PR, BRA).

Os ratos foram divididos em dois grupos: Controle (simbolizado pela letra C) e Tumor (simbolizado pela letra W). Cada um dos grupos foi subdividido como descrito abaixo:

- Grupo C: sem tumor, suplementado com veículo;
- Grupo P: sem tumor, suplementado com óleo de peixe rico em EPA;
- Grupo W: com tumor, suplementado com veículo;
- Grupo WP: com tumor, suplementado com óleo de peixe rico em EPA.

No dia seguinte à inoculação do tumor, iniciou-se a suplementação com óleo de peixe com uma concentração de EPA três vezes maior que as preparações comuns (540mg de EPA), da marca Naturalis, a 1g/kg de peso corporal por dia, por 14 dias consecutivos. O grupo controle recebeu água para simulação do estresse causado pela suplementação. Este procedimento foi realizado com o auxílio de uma pipeta semiautomática e o peso dos animais foi aferido em dias alternados. Nos últimos dois dias de suplementação, os ratos foram individualmente alocados em gaiolas metabólicas para a coleta da urina de 24 horas e a ingestão diária de água e comida. Sendo o primeiro dia utilizado para ambientação dos animais e as medições feitas no segundo dia. Ao final do período de suplementação, foram coletadas amostras de sangue dos animais por punção intracardíaca e foi realizada a eutanásia por aprofundamento anestésico, retirada dos rins para pesagem, e dissecação do tumor.

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná – UFPR

(Certificado nº 1081) e estão de acordo com a lei federal 11.794 de 08 de outubro de 2008.

3.2 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR

As células do carcinossarcoma Walker-256 foram obtidas da Universidade Estadual de Londrina, através de parceria com o Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, do Laboratório de Metabolismo Celular da UFPR. Para implantação do tumor, 4×10^8 células suspensas em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM e fosfato 16,5 mM), pH 7,4, foram injetadas no peritônio de dois ratos, para que ocorresse a expansão, formando um tumor ascítico. Após 5 dias da injeção, estes ratos foram sacrificados e o líquido ascítico foi aspirado do peritônio, ressuspendido em PBS e injetado no peritônio de outro rato, totalizando duas passagens de expansão, aumentando a quantidade de células e a virulência.

Após a aspiração do líquido ascítico do segundo animal, as células foram ressuspendidas em PBS e um volume de 1 ml, contendo 4×10^8 células, foi injetado no tecido subcutâneo do flanco direito dos animais do grupo W. Os ratos do grupo C receberam PBS no mesmo local.

3.3 PARÂMETROS METABÓLICOS

Os animais foram individualmente alocados em gaiolas metabólicas (Tecniplast, Italia) por 2 dias, sendo o primeiro dia o período de ambientação dos animais, sem coleta de dados. Durante o segundo dia foi obtida a urina de 24 horas dos animais, e também foi avaliada a ingestão diária de água e comida, sendo inicialmente ofertada a cada rato 30g de ração e 100g de água.

3.4 EUTANÁSIA

No décimo quinto dia de experimento foi realizada a eutanásia dos animais, anestesiados previamente com solução de xilasina e cetamina a 6mg/kg e 40mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal. As amostras de sangue foram coletadas por punção intracardíaca e posteriormente os animais foram sacrificados por

aprofundamento anestésico. Foram retirados os rins e o tumor para pesagem e estes tecidos foram armazenados em freezer a -80 °C.

3.5 FILTRAÇÃO GLOMERULAR (CLEARENCE DE CREATININA)

A dosagem de creatinina plasmática e urinária foi feita utilizando o método de Jaffe modificado, com o kit comercial da marca Labtest Diagnóstica obtendo-se um resultado em mg/dL.

Para a determinação da filtração glomerular foram utilizadas as concentrações plasmática e urinária de creatinina e a diurese, que foi obtida em ml/24 horas e expressa em ml/min. O cálculo do *clearance* de creatinina (Ccr), cujo resultado determina a taxa de filtração glomerular está descrito abaixo:

$$Ccr = (Ucr \times Vu / Pcr) / Ma$$

No qual:

Ucr = concentração urinária de creatinina (mg/dL);

Vu = volume urinário (mL/min);

Pcr = concentração plasmática de creatinina (mg/dL);

Ma = peso do animal (kg).

3.6 EXCREÇÃO URINÁRIA DE PROTEÍNAS TOTAIS E ALBUMINA

A concentração de proteínas totais no plasma foi determinada pela técnica de Biureto (HENRY; WINKELMAN; CANNON, 1974), utilizando o kit comercial da marca Katal. Para obter a concentração urinária de proteínas totais foi utilizado o método de vermelho de pirogalol, com kit comercial da marca Weiner lab. Em ambas as técnicas as amostras foram lidas em espectrofotômetro (Thermo Scientific) a 545nm e 600nm, respectivamente, e os resultados foram obtidos em g/dL.

Também foi determinada a excreção urinária de albumina por eletroforese em gel de SDS- poliacrilamida (SDS –PAGE) a 10%. As amostras foram preparadas adicionando-se o agente redutor de pontes dissulfeto β-mercaptoetanol, para que ocorresse a desnaturação proteica, permitindo a passagem pelo gel. A urina dos grupos controle foi diluída a 10%, enquanto a urina dos grupos tumor foram utilizadas sem diluição, pois a urina estava menos concentrada. Posteriormente o gel foi corado com Azul de Comassie e se quantificou a albumina presente nas

amostras utilizando o fotodocumentador Amersham Imager 600 da General Electric®.

3.7 TRIGLICERÍDOS

A concentração de triglicerídeos no plasma foi determinada por teste enzimático colorimétrico de Vida Biotecnologia. A partir da hidrólise dos triglicerídeos pela enzima lipoproteína lipase, e de uma série de reações posteriores é produzido a quinonimina, que possui uma cor rosa, que foi lida em 500nm pelo espectrofotômetro.

3.8 MANEJO RENAL DE SÓDIO

A concentração de Na⁺ plasmática e urinária foi medida pela técnica de fotometria de chama, no qual a amostra é queimada, gerando uma chama colorida, que é medida pelo fotômetro (Digimed DM-63) resultando em uma concentração em mEq/L. Com estes resultados foi calculada a fração de excreção de sódio (FE Na⁺), determinando o manejo renal de sódio. O cálculo resulta em um valor em porcentagem, e é feito da seguinte maneira:

$$FE\ Na^+ = (U_{Na^+} \times V_u / P_{Na^+}) / C_{cr}$$

No qual:

U_{Na^+} = concentração urinária de Na⁺ (mEq/L);

C_{cr} = clearance de creatinina (mL/min);

P_{Na^+} = concentração plasmática de Na⁺ (mEq/L);

V_u = volume urinário (mL/min).

3.9 OSMOLARIDADE

A determinação da osmolaridade plasmática e urinária foi feita pelo método de pressão de vapor (MicroOsmômetro – Vapro5520 – Vapor Pressure Osmometer, WESCOR-USA). Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo do clearance osmolar (C_{osm}) e do clearance de água livre (C_{H_2O}), a partir das fórmulas representadas abaixo:

$$C_{osm} = (U_{osm} \times V_u / P_{osm}) / M_a$$

$$C_{H_2O} = C_{osm} - V_u$$

Nas quais:

U_{osm} = osmolaridade da urina (mOsm/L);

V_u = volume urinário (mL/min);

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

M_a = peso do animal (kg).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação de dois grupos foi utilizado teste t enquanto para a comparação de quatro grupos foi utilizada Análise de Variância de uma via com teste posthoc de Tukey. As análises e gráficos foram gerados com Rstudio versão 4.0.3 (2020-10-10), copyright The R foundation for statistical computing. O critério de significância estatística foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 O MODELO

A fim de estudar os efeitos da suplementação com EPA sobre a função renal durante o câncer, foi utilizado o modelo de injeção subcutânea de células do carcinossarcoma Walker-256. Este modelo confere um tumor encapsulado sólido de crescimento rápido com geração de caquexia dentro de duas semanas (COELHO, 2010).

A TABELA 1 mostra a variação de peso inicial e final dos animais, descontando-se o peso do tumor do peso final, a fim de obter-se o peso real dos animais. Os grupos injetados com células tumorais apresentaram um ganho menor, mas sem atingir significância estatística. Apesar disso, em trabalhos em que se utiliza este modelo, é observada diferença expressiva na variação de peso, sendo o peso final significativamente menor no grupo injetado (COELHO, 2010; FRACARO, 2017). A última coluna da TABELA 1 representa numericamente a variação de ganho de peso, não aparecendo diferenças estatísticas entre os grupos. A curva de ganho de peso ao longo dos 14 dias de experimento está representada em % de ganho na FIGURA 7, sem se descontar o peso tumoral da medida final. Pode ser observado que a curva de ganho de peso dos animais injetados com células tumorais foi mais lenta que a dos animais controle.

Apesar de o modelo promover um crescimento rápido e acentuado de um tumor, foram necessários três grupos W para observar este desenvolvimento em todos os animais. Das tentativas anteriores, dois animais desenvolveram tumor. Eram animais suplementados com óleo e foram incluídos ao grupo PW para análise estatística. Provavelmente isto ocorreu em função das células tumorais terem perdido a virulência ao longo dos anos em utilização. Buscando aumentar a virulência, no presente trabalho foram feitas duas passagens intraperitoneais consecutivas antes da injeção subcutânea.

O peso tumoral dos grupos W está mostrado na TABELA 1, não apresentando diferença estatística entre CW e PW. Em média, os tumores de PW pesaram 7,98 (g) enquanto os de CW pesaram 1,59 (g). No entanto, nos trabalhos de Coelho (2010) e Fracaro (2017), as massas tumorais obtidas foram de 16 e 27

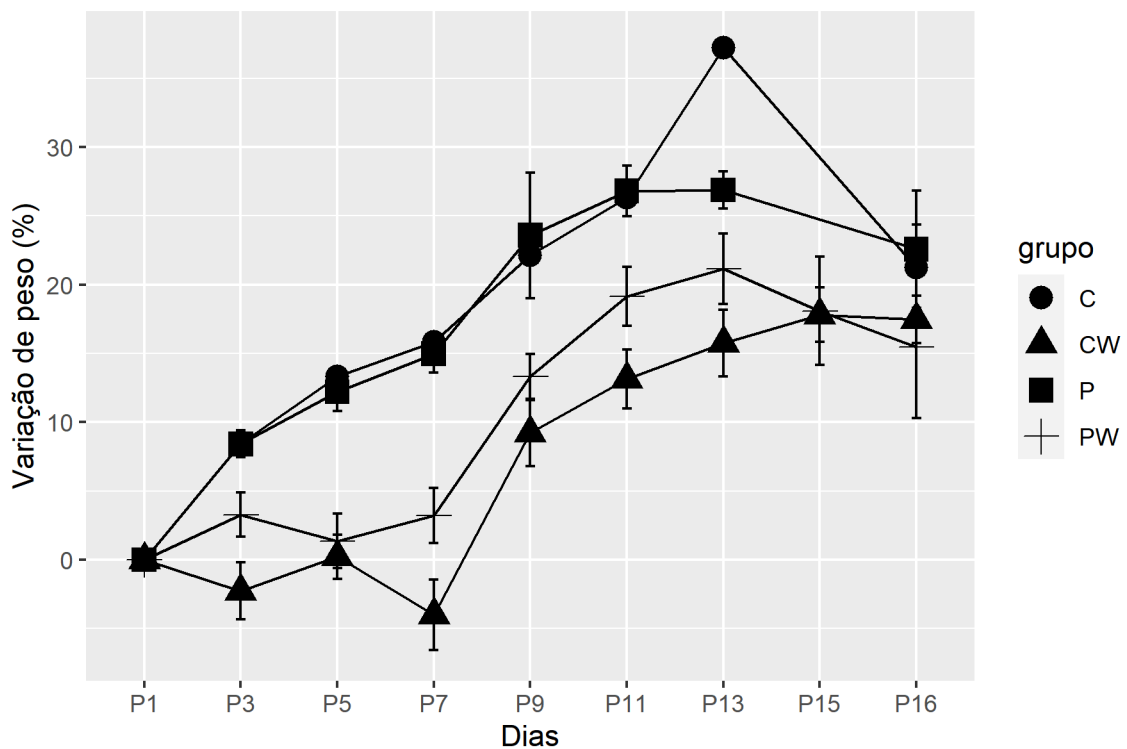
gramas, respectivamente para os animais controle. Portanto, não se conseguiu um aumento de virulência expressivo.

TABELA 1 – PESO CORPORAL E DO TUMOR

Grupo	n	Peso inicial (g)	Peso Final (g)	Peso Tumor (g)	% peso tumor	Ganho de peso (g)
C	3	286±10,4	347± 6,98	0	0	60,3±7,45
P	3	290±649	355±4,33	0	0	65±10,8
CW	4	294±5,36	345±7,46	1,59±0,284	0,456±0,075	51,2±4,94
PW	6	274±4,74	322±12,5	7,98±3,45	2,38±1,03	48,5±10,3

Peso inicial (g); Peso final (g) descontado do peso do tumor; Peso do tumor (g); porcentagem que o peso tumoral representou em relação ao peso final; ganho de peso representado em peso final (g) menos peso inicial (g). Dados expressos em média ± erro padrão da média. FONTE: O autor (2021).

FIGURA 7 – CURVA DE GANHO DE PESO



Curva de ganho de peso em dias, representada pela porcentagem de variação obtida entre cada medida. As medidas foram feitas a cada dois dias durante os 14 dias de experimento. Grupos C (n=3); CW (n=4); P (n=3); PW (n=4). FONTE: O autor (2021)

4.2 INGESTA DE ÁGUA E ALIMENTO

Os resultados obtidos durante o uso da gaiola metabólica estão mostrados na TABELA 2. O consumo de comida não apresentou diferença entre grupos, apesar disso existiu uma tendência de aumento de consumo de comida pelo grupo CW, indicando que a presença do tumor estava aumentando a demanda por energia. Mesmo que anorexia seja uma característica da caquexia, como observado no trabalho de Rettori (2000), também foi observada caquexia sem a diferença na ingestão de comida (FRACARO, 2017). A ingestão de água, por outro lado, tende a estar aumentada durante a síndrome, pela retenção de água e sódio associada a um aumento na secreção de aldosterona e pela secreção inadequada de ADH (COELHO, 2010; RETTORI; VIEIRA-MATOS; GONTIJO, 2000). Este aumento de consumo pode ser observado, mas sem chegar a significância estatística. O grupo CW apresentou uma tendência de aumento de consumo de água em relação ao grupo C ($p=0,09$) e o grupo PW, da mesma maneira, apresentou uma tendência de consumo maior de água em relação ao grupo P ($p=0,08$). A diurese e o peso dos rins não apresentaram diferença significativa entre os grupos, como também foi observado por Coelho (2010) utilizando o mesmo modelo.

TABELA 2 – PARÂMETROS METABÓLICOS

Grupo	n	Comida (g)	Água (g)	Diurese (ml/24h)	Peso dos Rins (g)
C	3	12,3±6,23	25,3±2,91	19,5±1,3	2,84±0,203
P	3	14±6,56	25±3	18,4±3,29	3,08±0,113
CW	4	27,9±1,66	36,8±1,11	23,2±1,43	2,54±0,139
PW	6	17,9±5,33	35±3,10	21,6±3,16	2,52±0,13

Quantidade de comida (g) consumida em 24h; quantidade água (g) consumida em 24h; diurese obtida em ml/24h; peso do rim direito e esquerdo (g). Dados expressos em média ± erro padrão da média. FONTE: O autor (2021).

4.3 PARÂMETROS PLASMÁTICOS

A creatinina é uma substância endógena resultante do metabolismo da creatina pelos músculos esqueléticos. Esta substância é liberada no plasma a uma taxa relativamente constante e é filtrada livremente nos glomérulos. Um aumento na concentração plasmática de creatinina pode significar que exista uma lesão renal, apesar de estes parâmetros não apresentarem relação linear (KOOMAN, 2009). Na

TABELA 3 está representado o resultado obtido para a creatinina plasmática nos grupos, não havendo diferença significativa entre os mesmos. Porém, existiu uma tendência de aumento da concentração de creatinina plasmática nos grupo tumor, em relação aos grupos controle.

A proteinemia também é mostrada na TABELA 3, não apresentando diferença significativa entre grupos. Durante a caquexia, a proteinemia tende a ser significativamente menor, pelo aumento do catabolismo de proteínas promovido por fatores como o PIF, e pela menor ingestão de alimento (PIZATO et al., 2006). Este dado foi encontrado no trabalho de Coelho (2010). A baixa concentração de proteínas plasmáticas é um dado clínico importante para o diagnóstico de caquexia tumoral (FEARON et al., 2011), e o fato de isto não ter sido observado nos animais, associado à ausência de anorexia, indica que não entraram em caquexia após 14 dias da implantação das células tumorais.

A concentração plasmática de Na^+ também esta representada na TABELA 3. Foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos CW e C. O tumor Walker-256 promove maior retenção de Na^+ no plasma (RETTORI; VIEIRA-MATOS; GONTIJO, 2000), sendo consistente com o resultado obtido. No entanto, a concentração de Na^+ plasmática obtida para o grupo C está abaixo do considerado normal (em torno de 140mEq), mostrando que, ou estes animais encontravam-se hiponatrêmicos, ou ocorreu algum problema de calibração do fotômetro no momento da medição. Já a concentração plasmática de Na^+ nos grupos P e PW não apresentou alteração, demonstrando um possível efeito benéfico da suplementação com EPA.

O parâmetro utilizado para avaliação da suplementação com EPA foi a concentração de triglicerídeos plasmáticos. É esperada uma diminuição significativa da concentração de triglicerídeos plasmáticos com a suplementação com EPA, tanto em humanos (YANG et al., 2020), quanto em ratos (CASSOL et al., 2020). No entanto, não houve diferença estatística significativa entre os grupos no presente trabalho, apesar de se ter observado uma tendência à diminuição no grupo P, que não foi significativa devido ao n baixo deste grupo. A presença do tumor pode ter interferido neste parâmetro, sendo encontrando um aumento na concentração plasmática de triacilglicerol em ratos portadores do tumor Walker-256 (SILVÉRIO et al., 2012). Isto pode ser devido à baixa atividade da Carnitina Palmitoiltransferase no fígado, enzima responsável pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a

mitocôndria. Este aumento promovido pelo tumor não foi revertido pela suplementação.

TABELA 3 – PARÂMETROS PLASMÁTICOS

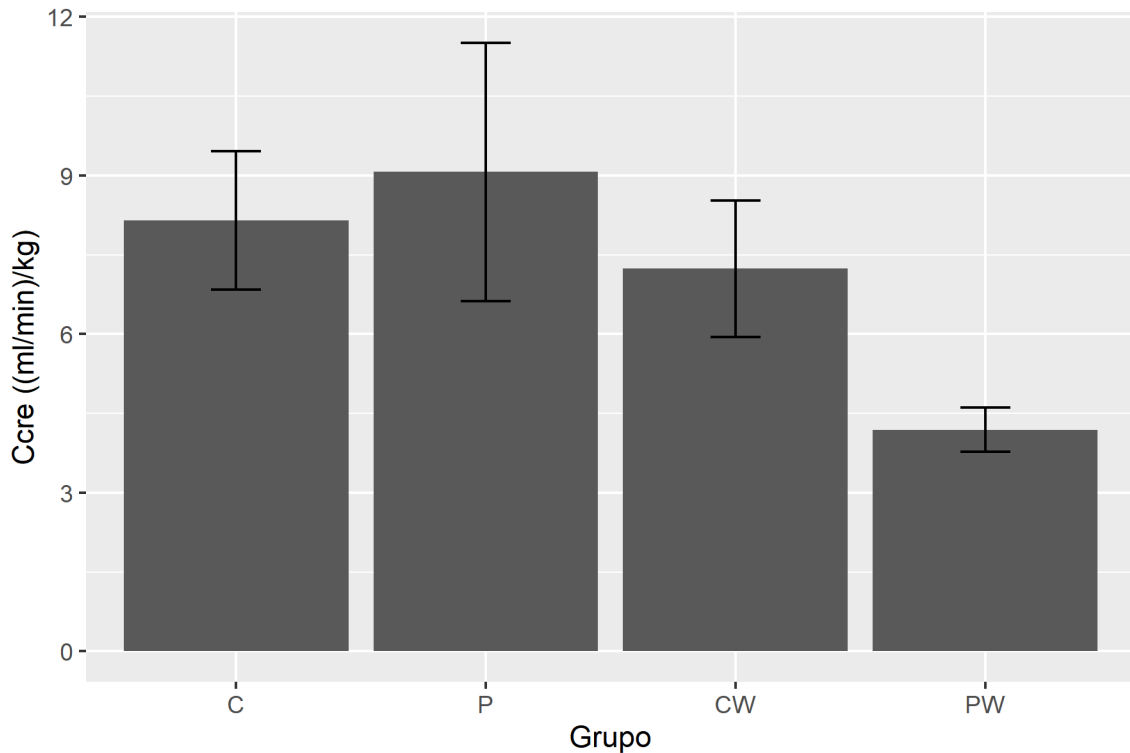
Grupo	n	Creatinina plasmática (mg/dL)	Proteinemia (mg/dL)	Na ⁺ plasmático (mEq/L)	Triglicerídeos (mg/dL)
C	3	0,411±0,058	5,03±0,08	115±11,1	23,3±9,18
P	3	0,369±0,065	5,71±0,13	138±4,51	15,3±4,17
CW	4	0,722±0,117	5,62±0,31	154±2,65*	52,6±14,1
PW	6	0,734±0,087	5,59±0,214	140±9,80	78,1±42,8

Concentração de creatinina plasmática (mg/dL); concentração de proteínas plasmáticas (mg/dL); concentração de sódio plasmático (mEq/L); concentração de triglicerídeos plasmáticos (mg/dL). Dados expressos em média ± erro padrão da média. *p<0,05. FONTE: O autor (2021).

4.4 FUNÇÃO RENAL

Para a avaliação da função renal, foram utilizados o *clearance* de creatinina como determinante da taxa de filtração glomerular, a excreção urinária de proteínas totais e albumina para avaliação da integridade da barreira de filtração glomerular, a fração de excreção de Na⁺ para a avaliação do manejo renal deste íon, e a osmolaridade plasmática e urinária para avaliar a capacidade de concentração e diluição renais.

A FIGURA 8 mostra o *clearance* de creatinina entre os grupos. Este parâmetro não sofreu alteração significativa nem pela presença do tumor, nem pela suplementação. O *clearance* de creatinina apresentou tendência ao aumento no grupo P, já que o EPA possui características vasodilatadoras, que podem promover maior filtração glomerular. Esta tendência também foi observada no trabalho de Cassol (2020), que utilizou suplementação de mesma concentração por 14 dias em ratos saudáveis, atingindo valores próximos à significância estatística (p=0,054). Já no grupo PW, a suplementação não teve este efeito. O *clearance* de creatinina neste grupo foi menor que no grupo P, apesar de não chegar à significância (p=0,063).

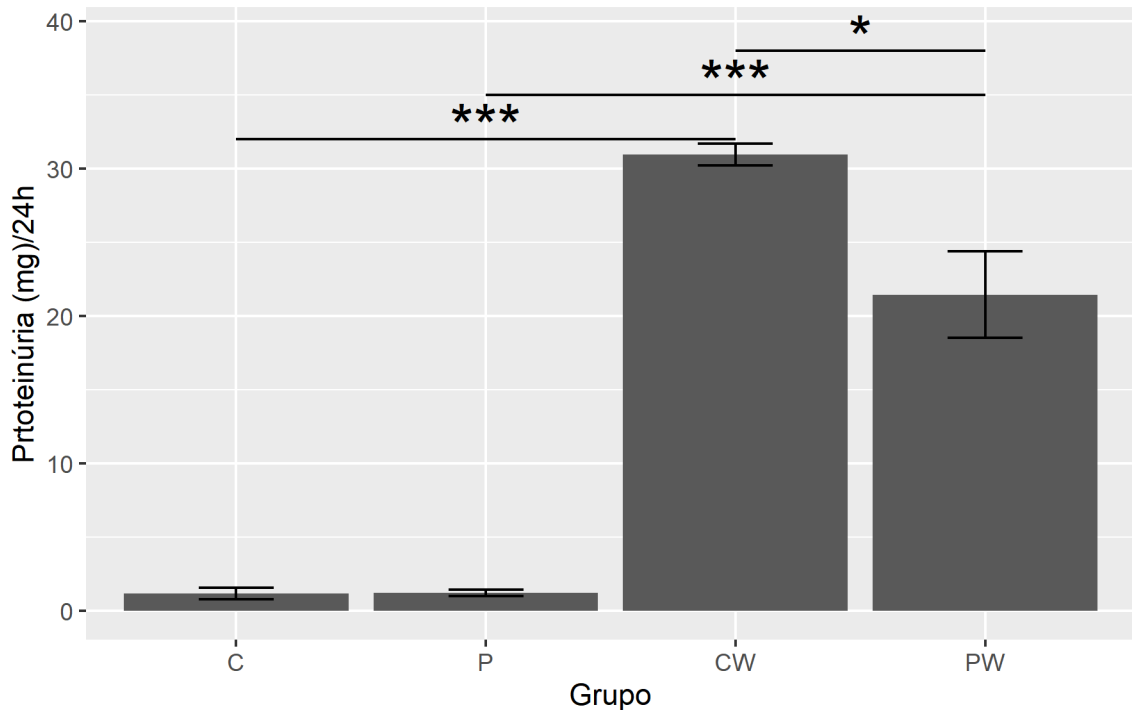
FIGURA 8 – *CLEARENCE* DE CREATININA

Clearence de creatinina (ml/min) normalizado pelo peso (kg) do animal. A barra de erro representa o erro padrão da média. Grupos C (n=3); CW (n=4); P (n=3); PW (n=6). FONTE: o autor (2021).

Pacientes com câncer podem desenvolver glomerulopatias associadas aos produtos secretados pelo tumor, como hormônios e antígenos tumorais (PANI et al., 2016). Em animais portadores de tumor também foi observado a presença de lesões glomerulares e proteinúria intensa (TAKEDA et al., 2012).

Apesar das proteínas plasmáticas não terem apresentado diferenças estatísticas, o que determinaria o modelo de caquexia, na excreção urinária de proteínas houve diferenças importantes entre os grupos. Nos grupos CW e PW foi observada uma proteinúria significativa, que foi menor no grupo suplementado, indicando uma possível lesão na barreira de filtração glomerular. Entre os grupos C e P não houve diferença significativa, mostrando que suplementação não alterou este parâmetro na condição saudável.

FIGURA 9 – PROTEINÚRIA TOTAL EM 24H



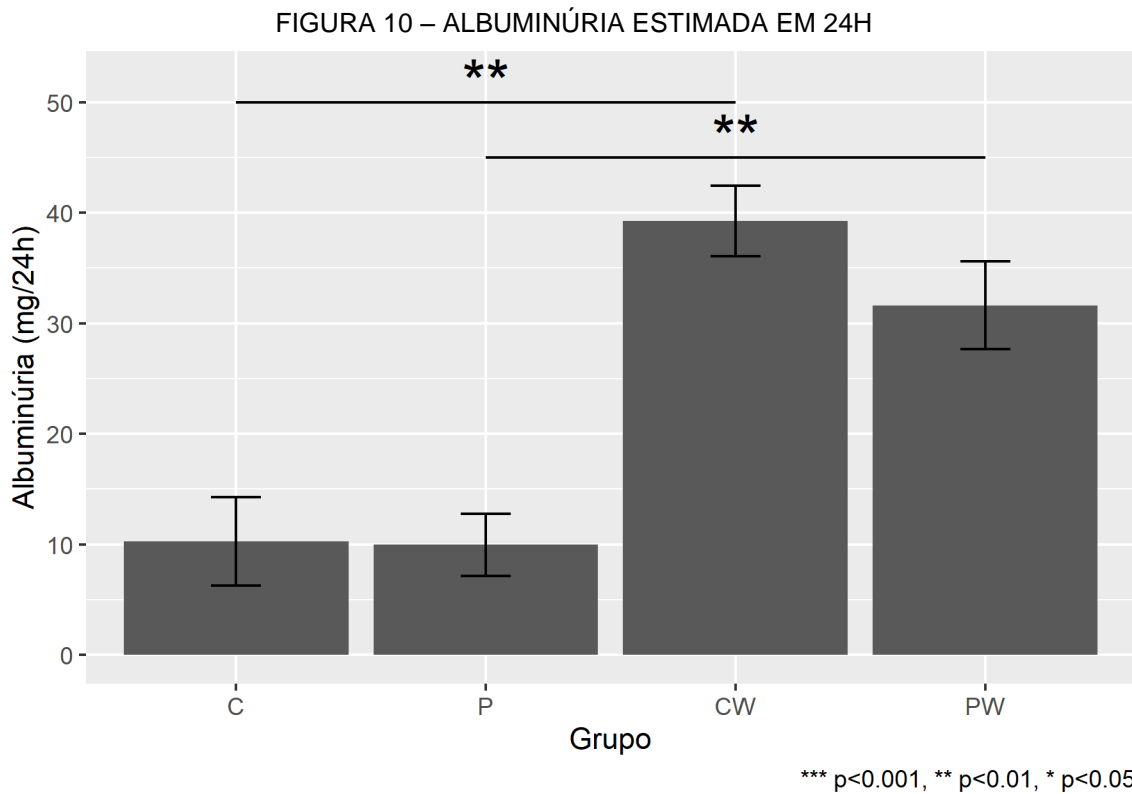
*** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05

Concentração de proteínas excretadas na urina obtida em (mg/dl) e expressa em (mg/24h) através da diurese. A barra de erro representa o erro padrão da média. ***p<0,001; *p<0,05. Grupos C (n=3); CW (n=4); P (n=3); PW (n=6). FONTE:o autor (2021).

A barreira de filtração glomerular possui três camadas: um endotélio fenestrado, com glicocálice carregado negativamente; a membrana basal glomerular e os podócitos. Esta barreira impede quase completamente a passagem de albumina e outras proteínas de maior peso molecular (BUTT et al., 2020). Na FIGURA 10 está representada a excreção estimada de albumina em 24h. Da mesma forma que para a proteinúria total, foi observada uma albuminúria significativa nos grupos tumorais, no entanto, uma diferença estatística entre PW e CW não foi observada, apesar de se ter uma tendência a ser mais baixa em PW, corroborando com os achados para proteinúria total. Neste caso, a diferença significativa pode não ter aparecido pelo n do grupo PW ser menor do que o n do grupo PW na análise da proteinúria total.

Estes resultados mostram que apesar dos animais não terem desenvolvido caquexia de maneira completa, possivelmente desenvolveram uma lesão renal, que precisaria ser confirmada por microscopia eletrônica. Ainda, a suplementação com

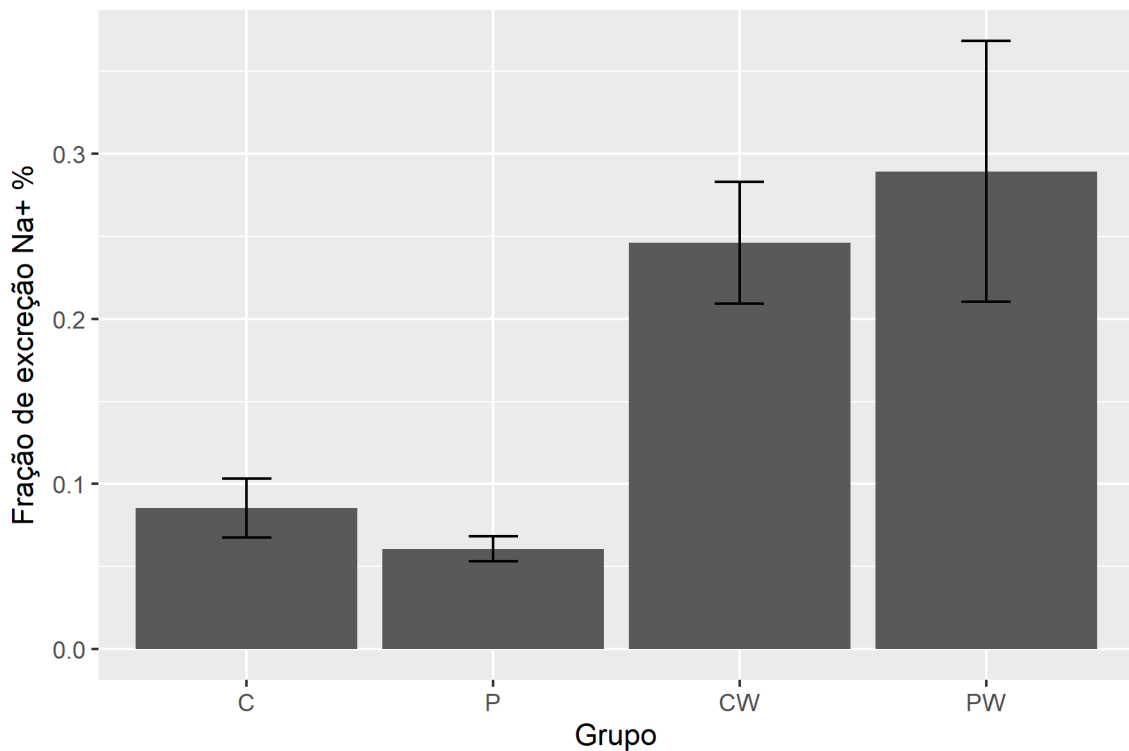
EPA provavelmente exerceu um efeito protetor sobre a barreira de filtração, visto que a proteinúria foi menor no grupo suplementado.



Concentração de albumina na urina obtida em (mg/mL) e expressa em (mg/24h) através da diurese. A barra de erro representa o erro padrão da média. ***p<0,001; **p<0,01. Grupos C (n=3); CW (n=4); P (n=3); PW (n=4). FONTE: o autor (2021)

Os rins são os órgãos responsáveis pela manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico, regulando o volume e osmolaridade do líquido extracelular. Para isto, os rins exercem controle sobre a reabsorção de Na^+ e água nos túbulos renais (AIRES, 2018). A FIGURA 11 mostra a fração de excreção de Na^+ obtida em 24h. Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos, apesar de os valores dos grupos PW e CW terem uma tendência a serem maiores que nos grupos C e P. No entanto, isto pode ser resultado da baixa concentração plasmática de Na^+ obtida nos grupos C e P, já que seria esperada maior fração de excreção de Na^+ nestes grupos, como mostra o trabalho de Fernandez (2004), que utilizando o mesmo modelo de tumor, obteve fração de excreção no grupo com tumor Walker significativamente menor que os controles (p<0,05).

FIGURA 11 – FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE SÓDIO



Fração De excreção de sódio representada em %. A barra de erro representa do erro padrão da média. Grupos C (n=3); CW (n=4); P (n=3); PW (n=6). FONTE: o autor (2021).

As osmolaridades plasmáticas e urinárias, assim como o *clearance* osmolar e de água livre estão representadas na TABELA 4. As osmolaridades plasmáticas não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Apesar disso, a osmolaridade plasmática do grupo CW apresentou valores mais baixos que o esperado em relação à concentração de sódio plasmático. Provavelmente houve algum problema metodológico e a medição será refeita no futuro.

O estado de caquexia, por outro lado, promove diminuição da osmolaridade plasmática, pela diminuição da proteinemia e da glicemia. Isto foi observado no trabalho de Coelho (2010), em que os animais portadores do tumor Walker-256 tiveram osmolaridade plasmática significativamente menor que os animais saudáveis ($p < 0,05$).

As osmolaridades urinárias também não apresentaram diferença entre grupos. O *clearance* osmolar apresentou uma tendência de estar aumentado no grupo CW, porém este resultado pode ter sido mascarado no cálculo de *clearance* pelo baixo valor encontrado para osmolaridade plasmática. O *clearance* de água livre não foi diferente entre os grupos, permanecendo em valores negativos. Isto

mostra que a capacidade renal de concentrar e diluir a urina está preservada, com níveis normais de ADH e reabsorção correta de água pelos segmentos distais do néfron.

TABELA 4 – OSMOLARIDADE

Grupo	n	Osmolaridade Plasmática	Osmolaridade Urinária	Clearance osmolar	Clearance de H₂O Livre
C	3	257±4,10	1031±267	0.156±0,0038	-0.101±0,041
P	3	265±9,25	1000±156	0.121±0,027	-0.108±0,029
CW	1	237±21,1	1218±326	0.237±0,018	-0.221±0,018
PW	5	268±7,42	998±265	0.164±0,026	-0.148±0,027

Osmolaridade plasmática (mOsm/L); osmolaridade urinária (mOsm/L); clearance osmolar (ml/min) normalizado pelo peso (kg); clearance de água livre (ml/min). FONTE: o autor (2021).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os objetivos do trabalho estava induzir o modelo de caquexia cauda pelo tumor Walker-256. No entanto, a menor proteinemia nos grupos portadores de tumor que significaria a alta catabolização de proteínas não foi atingida. Assim como a maior perda de peso e menor ingestão de comida esperada nos grupos injetados com células tumorais. Isto mostra que o modelo completo não foi atingido.

Apesar disso, a presença do tumor Walker-256 levou à alterações renais, que também eram esperadas com este modelo. A filtração glomerular apresentou tendência a ser mais baixa no grupo PW, este grupo teve tumores maiores que o grupo CW, apesar de não ter sido atingida diferença estatística entre os tamanhos dos tumores, e isto pode ter gerado esta diferença. Entretanto, apesar disso, no padrão de excreção de proteínas foi observado a maiores diferença entre os grupos, com maior excreção no grupo CW. O grupo PW apresentou estatisticamente menor excreção de proteínas totais, mostrando que a suplementação com EPA exerceu efeito protetor sobre a barreira de filtração glomerular. A lesão renal causada pelo tumor nestes animais precisaria ser confirmada por histologia do tecido renal, para evidenciar qual parte da barreira de filtração sofreu alteração.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros recomenda-se investigar quais segmentos da barreira de filtração glomerular ficam comprometidos pela presença do tumor Walker-256, assim como os mecanismos pelos quais a suplementação com EPA protege esta barreira.

REFERÊNCIAS

- (INCA), I. N. DE C. J. A. G. DA S. **Incidência de Câncer no Brasil 2020**. [s.l.: s.n.].
- AGUSTSSON, T. et al. Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. **Cancer Research**, v. 67, n. 11, p. 5531–5537, 2007.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 5^a edição ed. [s.l.] Grupo GEN, 2018.
- AOYAGI, T. et al. Cancer Cachexia, Mechanism and Treatment. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 7, n. 4, p. 17–29, 2015.
- ARGILÉS, J. M. et al. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: A link with obesity? **Medicinal Research Reviews**, v. 25, n. 1, p. 49–65, 2005.
- ARGILÉS, J. M. et al. The role of cytokines in cancer cachexia. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 3, n. 4, p. 263–268, 2009.
- ARGILÉS, J. M. et al. Cancer cachexia: Understanding the molecular basis. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754–762, 2014.
- BLASBALG, T. L. et al. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 5, p. 950–962, 2011.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BRUERA, E.; SWEENEY, C. Cachexia and asthenia in cancer patients. **Lancet Oncology**, v. 1, n. 3, p. 138–147, 2000.
- CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, 2011.
- CALDER. Invited Commentary Dietary arachidonic acid: harmful , harmless or helpful ? **British Journal of Nutrition**, p. 451–453, 2007.
- CALDER, P. C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids 1 , 2. **The Journal of Nutrition**, 2012.
- CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 645–662, 2013.
- CAMBIER, J. F.; RONCO, P. Onco-nephrology: Glomerular diseases with cancer. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, n. 10, p. 1701–1712, 2012.
- CASSOL, B. H. et al. A suplementação com óleo de peixe três vezes mais

concentrado em epa (ácido eicosapentaenoico) modifica a função renal em ratos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 466, 2020.

COELHO, I. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE A FUNÇÃO RENAL DE RATOS WISTAR CONTROLES E PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256 Dissertação. [s.l: s.n.].

DE CASTRO, II. SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE REVERTE PARCIALMENTE ALTERAÇÕES RENAIS GERADAS POR MODELO ANIMAL DE OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA. [s.l: s.n.].

ELEY, H. L.; TISDALE, M. J. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7087–7097, 2007.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: A new definition. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 793–799, 2008.

FANG, L. et al. EGF-like growth factors induce COX-2-derived PGE2 production through ERK1/2 in human granulosa cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 12, p. 4932–4941, 2013.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, 2011.

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, n. 10, p. 1481–1489, 2004.

FRACARO, L. Walker 256 tumor-bearing rats demonstrate altered interstitial cells of Cajal Effects on ICC in the Walker 256 tumor model. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

GORJAO, R. et al. New insights on the regulation of cancer cachexia by N-3 polyunsaturated fatty acids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 196, n. xxxx, p. 117–134, 2019.

GROSSBERG, A. J.; SCARLETT, J. M.; MARKS, D. L. Hypothalamic mechanisms in cachexia. **Physiology and Behavior**, v. 100, n. 5, p. 478–489, 2010.

HAO, C.-M.; BREYER, M. D. Physiological Regulation of Prostaglandins in the Kidney. **Annual Review of Physiology**, v. 70, n. 1, p. 357–377, 2008.

HAO, C. M.; BREYER, M. D. Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. **Kidney International**, v. 71, n. 11, p. 1105–1115, 2007.

HARRIS, R. C.; ZHANG, M. Z. Cyclooxygenase metabolites in the kidney. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 4, p. 1729–1758, 2011.

INACIO PINTO, N. et al. Cancer as a Proinflammatory Environment: Metastasis and

Cachexia. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015

JIA, Z. et al. Role of COX-2/mPGES-1/prostaglandin E2 cascade in kidney injury. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

KIM, G. H. Renal effects of prostaglandins and cyclooxygenase-2 inhibitors. **Electrolyte and Blood Pressure**, v. 6, n. 1, p. 35–41, 2008.

KOORMAN, J. P. Estimation of renal function in patients with chronic kidney disease. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 30, n. 6, p. 1341–1346, 2009.

LASKER, J. M. et al. Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of CYP4F2 and CYP4A11. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 6, p. 4118–4126, 2000.

LI, F. et al. Effects of dietary n-6:n-3 PUFA ratio on fatty acid composition, free amino acid profile and gene expression of transporters in finishing pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 5, p. 739–748, 2015.

LI, Y. et al. Prostaglandins in the pathogenesis of kidney diseases. **Oncotarget**, v. 9, n. 41, p. 26586–26602, 2018.

NØRREGAARD, R.; KWON, T. H.; FRØKJÆR, J. Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 34, n. 4, p. 194–200, 2015.

OH, D. Y. et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 687–698, 2010.

OH, S. et al. Glut1 promotes cell proliferation, migration and invasion by regulating epidermal growth factor receptor and integrin signaling in triple-negative breast cancer cells. **BMB Reports**, v. 50, n. 3, p. 132–137, 2017.

PANI, A. et al. Glomerular diseases and cancer: evaluation of underlying malignancy. **Journal of Nephrology**, v. 29, n. 2, p. 143–152, 2016.

PEIXOTO DA SILVA, S. et al. Cancer cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia, anorexia and asthenia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 11, n. 3, p. 619–635, 2020.

PHILIP C. CALDER. **Omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids and inflammation: From membrane to nucleus and from bench to bedside**. [s.l.: s.n.]. v. 3

PIZATO, N. et al. Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 425–432, 2006.
PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Oncogenesis**, v. 5, n. 2, p. 1–10, 2016.

RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A. N.; GONTIJO, J. A. R. Re-assessment of the

renal hydrosaline dysfunction in rats bearing the Walker-256 tumor. **Renal Failure**, v. 22, n. 6, p. 769–784, 2000.

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

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 349–361, 2008.

SILVA, F. S. DA et al. Enzymatic activity analysis of MMP-2 and 9 collected by swab from lower limb venous ulcers. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 13, n. 3, p. 229–234, 2014.

SILVÉRIO, R. et al. L-Carnitine induces recovery of liver lipid metabolism in cancer cachexia. **Amino Acids**, v. 42, n. 5, p. 1783–1792, 2012.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet: The omega-6/omega-3 ratio and the brain. **Molecular Neurobiology**, v. 44, n. 2, p. 203–215, 2011.

SMITH, I. J. et al. Calpain activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss. **Muscle and Nerve**, v. 43, n. 3, p. 410–414, 2011.

TAKEDA, S. ICHI et al. Development of features of glomerulopathy in tumor-bearing rats: a potential model for paraneoplastic glomerulopathy. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 27, n. 5, p. 1786–1792, 2012.

TARDIF, N. et al. Autophagic-Lysosomal pathway is the main proteolytic system modified in the skeletal muscle of esophageal cancer patients¹⁻³. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1485–1492, 2013.

TISDALE, M. J. Molecular Pathways Leading to Cancer. n. 37, 2005.

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 381–410, 2009.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, n. 2, p. 146–151, 2010.

USALAN, C.; EMRI, S. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with small cell lung carcinoma. **International Urology and Nephrology**, v. 30, n. 2, p. 209–213, 1998.

VARSHNEY, P.; YADAV, V.; SAINI, N. Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. **Immunology**, v. 149, n. 1, p. 13–24, 2016.

WADA, M. et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic

acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 31, p. 22254–22266, 2007.

WANG, M. et al. Induction of mammary differentiation by mammary-derived growth inhibitor-related gene that interacts with an ω -3 fatty acid on growth inhibition of breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 60, n. 22, p. 6482–6487, 2000.

WANG, T. et al. Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 1–28, 2019.

WANKHADE, U. D. et al. Novel Browning Agents, Mechanisms, and Therapeutic Potentials of Brown Adipose Tissue. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

WARFORD-WOOLGAR, L. et al. Selectivity of cyclooxygenase isoform activity and prostanoid production in normal and diseased Han:SPRD-cy rat kidneys. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 290, n. 4, p. 897–904, 2006.

WHITE, J. P. et al. Characterization of the male ApcMin/+ mouse as a hypogonadism model related to cancer cachexia. **Biology Open**, v. 2, n. 12, p. 1346–1353, 2013.

WHITEHOUSE, A. S. et al. Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. **Cancer Research**, v. 61, n. 9, p. 3604–3609, 2001.

WHITEHOUSE, A. S.; TISDALE, M. J. Increased expression of the ubiquitin - Proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF- κ B. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 6, p. 1116–1122, 2003.

WOOD, I. S.; TRAYHURN, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 1, p. 3–9, 2003.

YANG, Z. H. et al. Comparison of omega-3 eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation on plasma lipids and lipoproteins in normolipidemic adults. **Nutrients**, v. 12, n. 3, 2020.

YU, X. et al. Lung cancer with nephrotic syndrome as a paraneoplastic syndrome: A case report. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 13, n. 6, p. 1–4, 2020.

ZHAO, Y. et al. Eicosapentaenoic Acid Prevents LPS-Induced TNF- α Expression by Preventing NF- κ B Activation. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 71–78, 2004.

ZHOU, X. et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. **Cell**, v. 142, n. 4, p. 531–543, 2010.