



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Priscila Gomes Pereira

**Efeitos do óleo de capivara livre ou em nanoemulsão na histopatologia do
córtex renal de camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica**

Rio de Janeiro

2022

Priscila Gomes Pereira

**Efeitos do óleo de capivara livre ou em nanoemulsão na histopatologia do córtex renal
de camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica**

Tese apresentada, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
graduação em Biologia Humana e Experimental, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P436 Pereira, Priscila Gomes.

Efeitos do óleo de capivara livre ou em nanoemulsão na histopatologia do córtex renal de camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica / Priscila Gomes Pereira. – 2022.

91 f.

Orientador: Jorge José de Carvalho.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Ômega-3 (Ácidos graxos) – Uso Terapêutico – Teses. 2. Rins – Histopatologia – Teses. 3. Obesidade – Fisiopatologia – Teses. 4. Nanotecnologia – Teses. 5. Camundongos como animais de laboratório – Teses. I. Carvalho, Jorge José de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 665.2:616.61

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Priscila Gomes Pereira

**Efeitos do óleo de capivara livre ou em nanoemulsão na histopatologia do córtex renal
de camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica**

Tese apresentada, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
graduação em Biologia Humana e Experimental, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 23 de agosto de 2022.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Jemima Fuentes Ribeiro da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Marisa Maria Dreyer Breitenbach
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Vinicius Novaes Rocha
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.^a Dra. Polyana Cury Marinho
Centro Universitário Presidente Antônio Carlos

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico todo o meu esforço a Deus e a todas as pessoas que me amam e me querem bem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, Àquele em que tenho fé e creio ter me guiado nessa caminhada árdua: Deus.

Ao meu orientador, professor e chefe Doutor Jorge José de Carvalho por esses 11 anos! Agradeço a oportunidade, orientação, compreensão e atenção, tornando possível a realização e concretização dessa tese.

A professora Dra. Stela Regina Ferrarini do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) pela parceria para realização das análises físico-químicas do óleo de capivara e produção das nanoemulsões.

A Jemima Fuentes, por ser tão solícita quando mais precisamos! Só tenho a agradecer a você por toda a ajuda e momentos de descontração com suas histórias.

A Kíssila e Luciana, minhas amigas de laboratório e da vida! Agradeço muito a vocês por todos os conselhos, conversas produtivas, gargalhadas e por se fazerem tão presente para me ajudar nos momentos mais indecisos e conturbados. A amizade e companhia de vocês tornou tudo muito mais leve. Construímos um relacionamento de carinho, que será para sempre. Amo vocês!

A Bianca e Letícia, minhas parceiras lubtianas do Alzheimer! Obrigada por todos os momentos descontraídos, parceria no trabalho e amizade de vocês.

As meninas de iniciação científica, Raíssa e Marina por serem tão amáveis e prestativas!

A Ana Lúcia Rosa Nascimento, por sempre estar disponível para ajudar. Obrigada pela explicações, colorações, conversas e momentos de descontração.

A Caroline e Gilmar, por terem cuidado tão bem dos meus animais em experimentação no biotério.

A todos os integrantes do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual, por todo o companheirismo e espírito de equipe.

Ao LPCT, por sermos um grupo unido e com conversas descontraídas. Em particular, agradeço a Genilza por sempre estar disposta a ajudar sempre que precisei.

Aos meus pais, Elsa da Silva Gomes e Gilson Pinto Pereira (em memória), que sempre me incentivaram a seguir meus sonhos, me dando apoio e inspiração para traçar os caminhos que me levaram a essa conquista. Todas as vezes que o desânimo bate, basta eu lembrar do meu

pai chorando de emoção ao saber da minha aprovação no vestibular da UERJ para que eu tenha forças para continuar.

Aos meus avós Belmira da Silva Galhano e José Toste Gomes (em memória) e Ana Pinto Pereira por toda a compreensão, carinho, preocupação e amor ao longo desses anos.

A minha irmã, Gisele Gomes Pereira, por me inspirar simplesmente por existir. Obrigada por acreditar em mim quando nem eu mesma acredito, por estar sempre ao meu lado, escutando minhas dúvidas e questionamentos inacabáveis, me apoiando com muito carinho.

A toda a minha família, por todo o carinho que sempre tiveram por mim, desde o momento em que eu nasci!

Ao meu namorado, Bruno André Gomes da Silva, por estar comigo nessa trajetória me fazendo acreditar que tudo seria possível. Sem você, o caminho percorrido teria sido mais difícil. Agradeço por seu carinho, amor e paciência.

A todos os meus amigos, pelo carinho, tempo disponível para ouvir meus problemas, por dividirem comigo suas vidas, por terem me acolhido de uma forma tão carinhosa, por todas as ótimas conversas, por todos os momentos de descontração e pela amizade que será eterna.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

A Plataforma Rudolf Barth de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) pela utilização do microscópio eletrônico de varredura.

A Plataforma de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal Fluminense pela utilização do microscópio eletrônico de transmissão.

E a todos os membros da banca examinadora, que disponibilizaram seu tempo para agregar conhecimento e fazer parte desta conquista.

RESUMO

PEREIRA, Priscila Gomes. *Efeitos do óleo de capivara livre ou em nanoemulsão na histopatologia do córtex renal de camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica*. 2022. 91 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A obesidade é uma doença inflamatória e está associada a doenças secundárias como a doença renal, que ocorre devido ao acúmulo de lipídios no rim, podendo causar lipotoxicidade, inflamação e perda da função do órgão. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) atuam na produção de mediadores lipídicos e possuem características anti-inflamatórias. Os PUFAs podem fornecer benefícios à saúde, porém são facilmente oxidados em contato com o oxigênio, comprometendo a suplementação requerida pelo indivíduo. Uma forma de evitar essa oxidação e aumentar a biodisponibilidade dos PUFAs é a nanotecnologia farmacêutica, que possibilita também uma redução da dose do medicamento. Para avaliar a histopatologia do córtex renal de camundongos obesos, foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos com três meses de idade que foram alimentados com dietas controle ou hiperlipídica (60% de lipídeos) durante 18 semanas. Nas últimas 4 semanas, os animais receberam diariamente placebo, óleo de capivara (OC) livre (nas doses de 100 e 5000 mg/ kg) ou em nanoemulsão (100 mg/ kg). Foram analisados parâmetros como massa corporal, perfil lipídico, pressão arterial sistólica, função renal, estrutura e ultraestrutura do córtex renal, fibrose, inflamação tecidual e estresse oxidativo. Os tratamentos com OC livre (5000 mg/kg) e em nanoemulsão em camundongos obesos demonstraram melhora no perfil lipídico e redução nos níveis de pressão arterial sistólica, além de uma remodelação benéfica do córtex renal com preservação da membrana basal da cápsula de Bowman, glomérulos e túbulos contorcidos proximais e distais. Nossos dados demonstraram que ambos os tratamentos diminuíram a inflamação, o estresse oxidativo e a fibrose renal, conforme evidenciado pela quantificação da expressão de TNF- α , IL-10, CAT, SOD, α -SMA e TGF- β . No entanto, somente o tratamento com nanoemulsão de OC foi capaz de melhorar a função renal e diminuir a massa corporal, as concentrações de glicose e triglicerídeos no sangue. Portanto, nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que o tratamento com nanoemulsão de OC possui efeitos benéficos nas alterações sistêmicas e locais em camundongos obesos, sendo considerado um tratamento promissor para a doença renal associada à obesidade.

Palavras-chave: Obesidade. Lesão renal. Óleo de capivara. Ômega-3. Inflamação. Fibrose. Nanoemulsão.

ABSTRACT

PEREIRA, Priscila Gomes. *Effects of free capybara oil or in nanoemulsion on the histopathology of the renal cortex of C57Bl/6 mice fed a high-fat diet*. 2022. 91 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Obesity is an inflammatory disease and is associated with secondary diseases such as kidney disease, which occurs due to the accumulation of lipids in the kidney, which can cause lipotoxicity, inflammation and loss of organ function. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) act in the production of lipid mediators and have anti-inflammatory characteristics. PUFAs may provide health benefits, but they are easily oxidized in contact with oxygen, compromising the supplementation required by the individual. One way to avoid this oxidation and increase the bioavailability of PUFAs is pharmaceutical nanotechnology, which also makes it possible to reduce the dose of the drug. To evaluate the histopathology of the renal cortex of obese mice, three-month-old male C57Bl/6 mice were fed with control or high-fat diets (60% lipids) for 18 weeks. In the last 4 weeks, the animals received daily placebo, capybara oil (OC) free (at doses of 100 and 5000 mg/kg) or in nanoemulsion (100 mg/kg). Parameters such as body mass, lipid profile, systolic blood pressure, renal function, structure and ultrastructure of the renal cortex, fibrosis, tissue inflammation and oxidative stress were analyzed. Treatments with free OC (5000 mg/kg) and in nanoemulsion in obese mice showed improvement in lipid profile and reduction in systolic blood pressure levels, in addition to a beneficial remodeling of the renal cortex with preservation of the basement membrane of Bowman's capsule, glomeruli and proximal and distal convoluted tubules. Our data demonstrated that both treatments decreased inflammation, oxidative stress and renal fibrosis, as evidenced by quantifying the expression of TNF- α , IL-10, CAT, SOD, α -SMA and TGF- β . However, only OC nanoemulsion treatment was able to improve renal function and decrease body mass, blood glucose and triglyceride concentrations. Therefore, our results demonstrate, for the first time, that OC nanoemulsion treatment has beneficial effects on systemic and local changes in obese mice, being considered a promising treatment for obesity-associated kidney disease.

Keywords: Obesity. Kidney injury. Capybara oil. Omega-3. Inflammation. Fibrosis. Nanoemulsion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação esquemática do rim.....	19
Figura 2 –	Vista panorâmica histológica renal pela coloração de Hematoxilina-Eosina.....	20
Figura 3 –	Representação esquemática da ultraestrutura do capilar glomerular e do folheto visceral da cápsula de Bowman.....	21
Figura 4 –	Fotomicrografia da camada cortical do rim pela Coloração de Picrosirius-Hematoxilina.....	22
Figura 5 –	Diagrama simplificado da barreira de filtração glomerular.....	23
Figura 6 –	Fotomicrografia da ultraestrutura do córtex renal observado no microscópio eletrônico de transmissão.....	23
Figura 7 –	Representação da associação entre acumulação lipídica ectópica e a doença renal.....	27
Figura 8 –	Desenho experimental.....	39
Figura 9 –	Evolução da massa corporal dos grupos experimentais.....	48
Figura 10 –	Teste oral de tolerância a glicose (mg/ dL/ min) nos períodos pré e pós-tratamento de todos os grupos experimentais.....	49
Figura 11 –	Evolução da pressão arterial sistólica de todos os grupos experimentais nos períodos pré e pós-tratamento.....	50
Figura 12 –	Parâmetros bioquímicos no plasma de todos os grupos experimentais...	52
Figura 13 –	Parâmetros bioquímicos na urina de todos os grupos experimentais.....	54
Figura 14 –	Avaliação da morfologia do córtex renal em fotomicrografias de todos os grupos experimentais.....	56
Figura 15 –	Avaliação das membranas basais das estruturas do córtex renal em fotomicrografias dos grupos experimentais.....	57
Figura 16 –	Imunomarcção e quantificação no córtex renal com os anticorpos anti-TGF- β e anti- α -SMA.....	59
Figura 17 –	Imunomarcção e quantificação no córtex renal com os anticorpos anti-TNF- α e anti-IL-10.....	60
Figura 18 –	Avaliação da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo de todos os grupos experimentais.....	61

Figura 19 –	Análise da ultraestrutura renal por microscopia eletrônica de varredura de todos os grupos experimentais.....	63
Figura 20 –	Análise da ultraestrutura renal por microscopia eletrônica de transmissão de todos os grupos experimentais.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação internacional da obesidade segundo o índice de massa corporal (IMC) e risco de doença.....	15
Tabela 2 – Composição e conteúdo energético das dietas controle e hiperlipídica.....	37
Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos do óleo de capivara.....	45
Tabela 4 – Composição química do óleo de capivara.....	46
Tabela 5 – Caracterização físico-química da nanoemulsão branca (NB) e nanoemulsão contendo o óleo de capivara (OCN).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AG	Ácidos Graxos
AL	Ácido Linoléico
ALN	Ácido Alfa-Linolênico
ANOVA	Análise de Variância
BSA	Soro Albumina Bovina
CAT	Catalase
COX	Ciclooxigenase
CT	Colesterol Total
DAB	Diaminobenzidina
DDSA	Anidrido Dodecenil Succínico
DHA	Ácido Docosaexanóico
DMP	Tridimetilaminametilfeno
DPA	Ácido Docosapentaenóico
DRC	Doença Renal Crônica
EMT	Transição Epitelial-Mesenquimal
EPA	Ácido Eicosapentanóico
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HL	Hiperlipídica
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDL	Ipoproteína de Densidade Intermediária
IMC	Índice de Massa Corporal
PDI	Índice de Polidispersão
iNKT	Células T “natural killer” Invariantes
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MBG	Membrana Basal Glomerular
MC	Massa Corporal
MNA	Anidrido Metil Nádico
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B

OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PBS	Tampão Fosfato Salino
PG	Prostaglandina
PUFAs	Ácidos Graxos Poli-Insaturados
SM	Síndrome Metabólica
SOD	Superóxido Dismutase
SRAA	Sistema Renina angiotensina aldosterona
TG	Triglicerídeos
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TG	Triglicerídeos
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
VIGITEL	Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	OBJETIVOS.....	34
1.1	Objetivos Gerais.....	34
1.2	Objetivos Específicos.....	34
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1	Obtenção do óleo de capivara e produção da nanoemulsão.....	35
2.2	Animais e dieta.....	36
2.3	Massa corporal e pressão arterial sistólica.....	39
2.4	Teste oral de tolerância à glicose.....	40
2.5	Excreção urinária, eutanásia e obtenção das amostras de sangue e teciduais.....	40
2.6	Bioquímica plasmática e urinária.....	41
2.7	Histoquímica e Imunohistoquímica.....	41
2.8	Estresse oxidativo.....	42
2.9	Microscopia eletrônica de transmissão.....	43
2.10	Microscopia eletrônica de varredura.....	43
2.11	Análise estatística.....	44
3	RESULTADOS.....	45
3.1	Caracterização físico-química do óleo de capivara e da nanoemulsão.....	45
3.2	Análise da massa corporal.....	47
3.3	Análise do teste oral de tolerância a glicose.....	48
3.4	Análise da pressão arterial sistólica.....	49
3.5	Análise bioquímica plasmática.....	51
3.6	Análise bioquímica urinária.....	53
3.7	Análise histopatológica do córtex renal.....	55
3.8	Análise da fibrose renal.....	58
3.9	Avaliação na expressão de citocinas inflamatórias por imunohistoquímica	59
3.10	Análise da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo.....	61
3.11	Avaliação da ultraestrutura renal.....	62

3.11.1	<u>Microscopia eletrônica de varredura.....</u>	62
3.11.2	<u>Microscopia eletrônica de transmissão.....</u>	64
4	DISCUSSÃO.....	66
	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa.....	89
	ANEXO B – Submissão de artigo científico.....	90
	ANEXO C – Depósito de patente	91

INTRODUÇÃO

Obesidade

A obesidade foi primeiramente definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2000, como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura. Para ser classificado obeso, o indivíduo é avaliado quanto a sua adiposidade corporal. Para isso, calcula-se seu índice de massa corporal (IMC). O IMC é o resultado da divisão do peso em kg pela altura em metros elevada ao quadrado (kg/m^2). Indivíduos com IMC igual ou acima de 30 kg/m^2 são considerados obesos (Tabela 1). É muito utilizado pela facilidade e simplicidade de obtenção, além de poder ser empregado em todas as fases da vida (OLIVEIRA *et al.*, 2020). No entanto esse índice não leva em conta a massa magra nem a distribuição da gordura corporal. Considerando que o aumento de gordura visceral (intra-abdominal) é um fator de risco potencial para doenças, independentemente da gordura corporal total, é importante também ser feita a medição da circunferência abdominal.

Tabela 1 – Classificação internacional da obesidade para humanos segundo o índice de massa corporal (IMC) e risco de doença

Classificação	IMC	Risco de doença
Peso normal	$18.5\text{--}24.9 \text{ kg/m}^2$	Normal
Sobrepeso ou pré-obeso	$25\text{--}29.9 \text{ kg/m}^2$	Aumentado
Obesidade grau I	$30\text{--}34.9 \text{ kg/m}^2$	Moderado
Obesidade grau II	$35\text{--}39.9 \text{ kg/m}^2$	Severo
Obesidade grau III ou obesidade mórbida	$\geq 40 \text{ kg/m}^2$	Muito severo

Fonte: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000.

Com o aumento exponencial na prevalência da obesidade e o consequente interesse dos pesquisadores em estudar essa doença, esse conceito foi ampliado. A obesidade passou a ser definida como de origem multifatorial, resultante de fatores genéticos, fisiológicos, ambientais

e psicológicos, proporcionando o acúmulo excessivo de energia sob a forma de gordura no organismo (ROMIEU *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2003).

Segundo o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), as estimativas de prevalência de obesidade da população acima de 18 anos nas capitais brasileiras aumentaram de 15 para 18% de 2010 a 2014 e passaram para 20,3% em 2019, em ambos os sexos (BRASIL, 2020). De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde, ao longo de 17 anos a prevalência de obesidade mais que dobrou em 2019, tanto para homens (de 9,6% para 22,8%) quanto para mulheres (de 14,5% para 30,2%) (BRASIL, 2019). A projeção é que em 2025 cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões serão obesos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

Por ser uma doença multifatorial é difícil mensurar a influência de cada uma das variáveis envolvidas no processo de ganho de peso (BERNARDI *et al.*, 2005). Dados apontam que sua ocorrência está relacionada a fatores dietéticos e ambientais associados a uma predisposição genética (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000). O determinante mais imediato do acúmulo excessivo de gordura e, por consequência, da obesidade, é o balanço energético positivo. O balanço energético pode ser definido como a diferença entre a quantidade de energia consumida e a quantidade de energia gasta na realização das funções vitais e de atividades em geral. O balanço energético positivo acontece quando a quantidade de energia consumida é maior do que a quantidade gasta (COHEN, J. B.; COHEN, D. L., 2015; APOVIAN; GOKCE, 2012). Esse desequilíbrio é consequência de um estilo de vida mais sedentário e crescente consumo de alimentos ricos em energia levando a um acúmulo anormal ou excessivo de gordura, característico da obesidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018). Outros fatores também são associados ao peso corporal, tais como: sexo; idade; cor da pele; antecedentes familiares de obesidade; situação conjugal; nível socioeconômico; grau de escolaridade; tabagismo e consumo de álcool (GONZALEZ *et al.*, 2017; MENDONÇA; ANJOS, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Em um estado obeso, o tecido adiposo branco aumentado não serve apenas para armazenar triglicerídeos (TG), mas também secreta uma grande quantidade de adipocinas, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que tornam a obesidade um estado de inflamação crônica. A inflamação crônica e o aumento da lipólise contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina (COLLABORATION NCDRF, 2016; SHOELSON *et al.*, 2007). O aumento da lipólise no tecido adiposo na obesidade libera grande quantidade de ácidos graxos

(AGs) livres na corrente sanguínea, que influem em tecidos periféricos, causando lipotoxicidade aos tecidos (GANCHEVA *et al.*, 2018). A lipotoxicidade tecidual induz disfunção mitocondrial e promove estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático (RUAN *et al.*, 2009).

Diversas investigações associam a obesidade a outras doenças crônico-degenerativas, tais como dislipidemia, hiperinsulinemia, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, aterosclerose e esteatose hepática não alcoólica, que, em conjunto, contribuem para o aumento da morbimortalidade em todo o mundo, além de compreender o diagnóstico da síndrome metabólica (SM). Assim como a obesidade, a SM tem sua etiologia associada a fatores genéticos e ambientais e vem crescendo de forma alarmante (BLUHER, 2019; FOSTER-SCHUBERT; CUMMINGS; TOCK *et al.*, 2006).

Além disso, a obesidade tem sido reconhecida como um fator de risco importante e independente para o desenvolvimento de doença renal crônica (DRC) e doença renal terminal (CAMARA *et al.*, 2017; HSU *et al.*, 2006). No estado hiperlipidêmico crônico, o acúmulo excessivo de lipídios também ocorre no rim, onde a lipotoxicidade impulsiona a ativação de vias pró-inflamatórias, pró-fibrogênicas e pró-apoptóticas, causando lesão celular e disfunção renal (CHEN *et al.*, 2019; D'AGATI *et al.*, 2016; DE VRIES *et al.*, 2014).

Com o avanço da obesidade e de doenças associadas a ela, começaram a ser criados modelos experimentais animais para compreender melhor o papel que cada elemento envolvido tanto na sua fisiopatologia quanto nas suas morbidades associadas. Modelos animais são geralmente usados para explorar os mecanismos subjacentes à doença e investigar novas estratégias terapêuticas. Cada vez mais tem se utilizados modelos com a indução de dieta HL, já que esse modelo mimetiza as alterações metabólicas encontradas na obesidade metabólica (WEST; YORK, 1998; WINZELL; AHRÉN, 2004). As linhagens mais utilizadas para esses modelos são as linhagens isogênicas ou *inbred* de camundongos, sendo elas C57BL/6, C57BL/6J, AKR/J ou A/J (WHITE *et al.*, 2013).

Muitos pesquisadores têm utilizado preferencialmente dietas com alto teor de gordura, chamadas dietas HLs (em inglês *high-fat* ou HF) para gerar modelos de roedores obesos (LI *et al.*, 2020; SEO *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). A alimentação de camundongos com dieta rica em gordura é conhecida por induzir várias alterações sistêmicas, incluindo obesidade, hiperglicemia e metabolismo lipídico, que são semelhantes aos observados em pacientes com SM (SURWIT *et al.*, 1988; WEST *et al.*, 1992). A primeira descrição de que uma dieta HL induziu obesidade através de uma intervenção nutricional foi

em 1959 (MASEK; FABRY, 1959). Em ratos e camundongos existe uma relação entre o nível de gordura na dieta e o peso corporal ou ganho de gordura. O tipo de gordura também desempenha um importante papel, ou seja, nem todos os tipos de gordura são obesogênicas e o perfil de AGs da dieta é uma importante variável no desenvolvimento da obesidade dietética (HARIRI; THIBAUT, 2010).

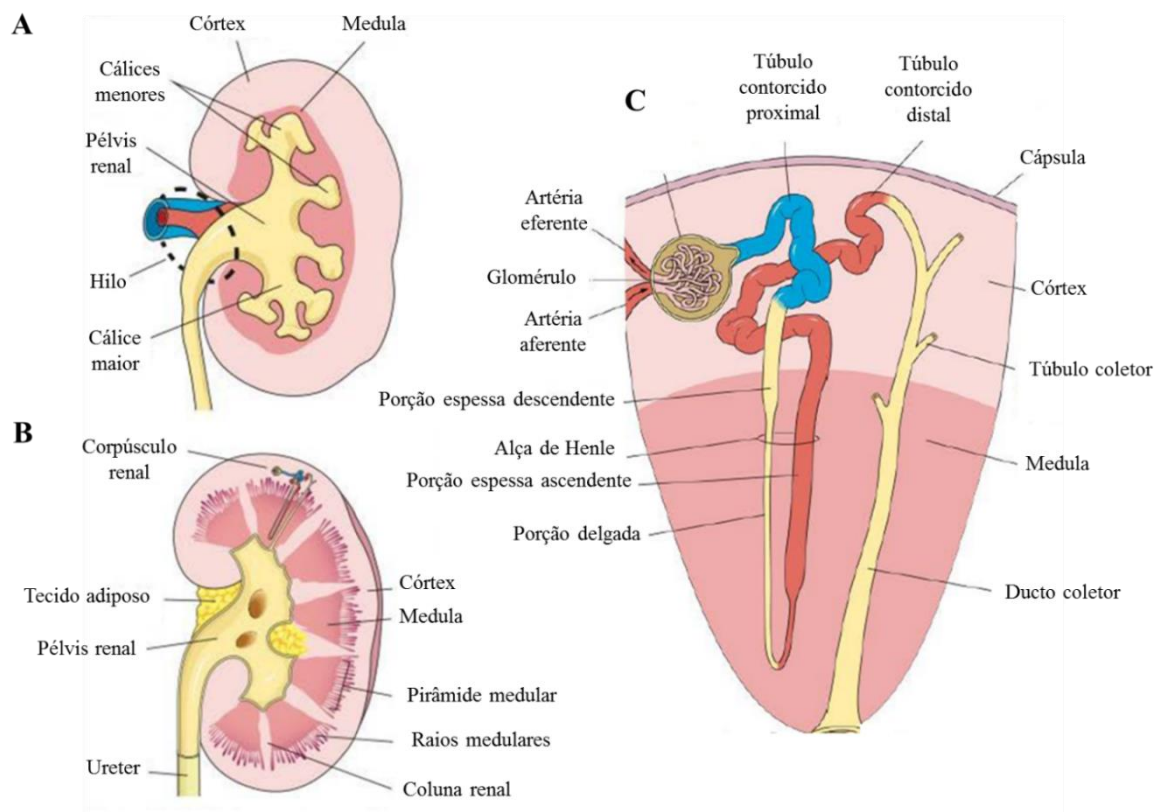
Nesse sentido, diferentes dietas têm sido usadas com composições de gordura que variam entre 20% e 60%, tendo como fonte a gordura de origem animal (ex: banha de porco ou sebo bovino) ou a gordura de origem vegetal (ex: óleo de milho) (BUETTNER *et al.*, 2007). No presente estudo buscamos avaliar as alterações fisiopatológicas e morfológicas renais durante a obesidade com administração de dieta rica em gorduras proveniente da banha de porco (60% da energia total) em linhagem de camundongos C57Bl/6. A escolha da dieta HL se deu devido a estudos que já observam que a administração dessa dieta a longo prazo é capaz de desenvolver diversas consequências nos animais, entre elas: obesidade, hiperinsulinemia, hiperglicemia, hipertensão e danos relacionados ao rim, com indução de disfunção lisossomal levando a lesão renal (DEJI *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2005; KUME *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2004; YAMAMOTO *et al.*, 2017;).

Histologia e função renal

Os rins são os órgãos responsáveis pela manutenção do volume e da composição do fluido extracelular de cada indivíduo dentro dos limites fisiológicos compatíveis com a vida. Eles desempenham suas funções através da filtração glomerular, reabsorção e secreção tubular, levando à excreção das substâncias indesejadas na urina. Além disso, os rins secretam hormônios e exercem importante papel na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico, da osmolaridade e do equilíbrio ácido-base. Os rins estão localizados na parede da cavidade retroperitoneal, são envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso e seu parênquima é constituído por uma zona cortical e medular. Cada rim possui uma borda convexa e outra côncava, na qual se situa uma região denominada hilo, por onde passam a artéria e a veia renal, o suprimento nervoso e o ureter. O parênquima renal é formado de duas regiões principais: o córtex, contendo túbulos contorcidos e glomérulos, que constitui a parte externa, e a medula, composta principalmente por túbulos retos, que constitui a parte interna. Na região medular,

observam-se projeções cônicas denominadas pirâmides renais que se projetam para a pelve renal, uma continuação da parte superior do ureter. A borda externa da pelve é formada pelos cálices maiores, que se dividem em cálices menores e coletam a urina proveniente dos túbulos (AIRES, 2008; GUYTON; HALL, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; RIELLA, 2003). A representação esquemática e a vista panorâmica histológica renal podem ser evidenciadas nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

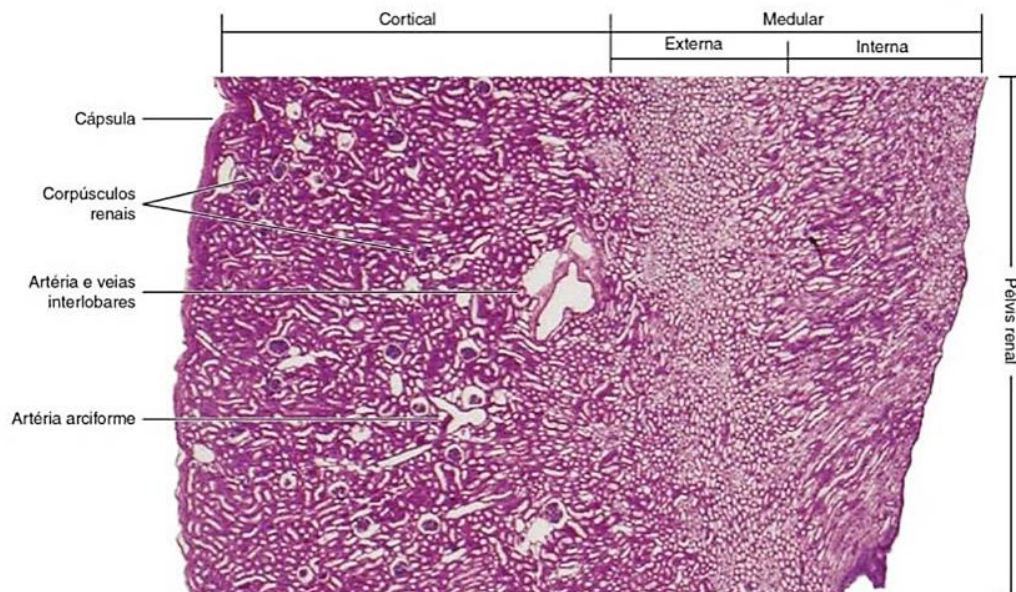
Figura 1 – Representação esquemática do rim



Legenda: Estrutura macroscópica do rim (A); Destaque da região cortical e medular (B); Organização com detalhes do córtex, medula e dos componentes do néfron, tais como: corpúsculo renal (composto pelo glomérulo e cápsula de Bowman), túbulos contorcidos proximal e distal e alça de Henle (C)).

Fonte: Adaptada de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017.

Figura 2 – Vista panorâmica histológica renal pela coloração de Hematoxilina-Eosina



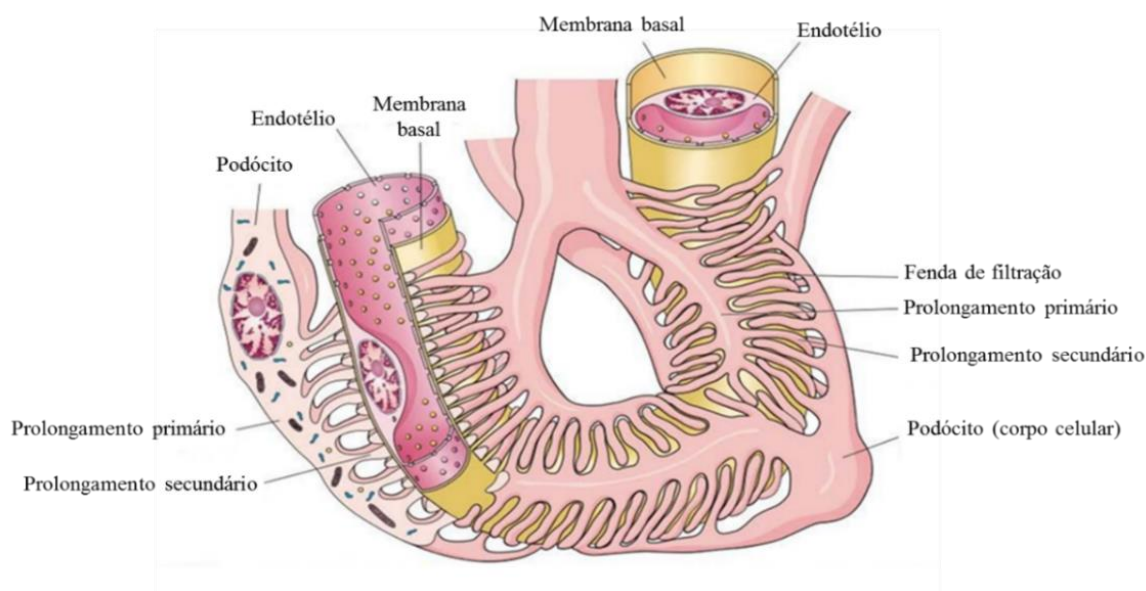
Nota: A fotomicrografia evidencia a cápsula de tecido conjuntivo denso; a zona cortical, na qual é possível identificar corpúsculos renais distribuídos pelo córtex; a zona medular subdividida em regiões medular externa, com vasos de maiores calibres, e interna. Fotomicrografia em pequeno aumento.

Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017.

A unidade funcional do rim é o néfron, formado pelo corpúsculo renal, túbulo proximal, alça de Henle e túbulo distal. O túbulo contorcido distal encosta-se no corpúsculo renal do mesmo néfron, e, nesse local, sua parede se modica. Suas células tornam-se cilíndricas e altas, com núcleos alongados e próximos uns dos outros. Esse segmento modificado da parede do túbulo distal, que aparece mais escuro nos cortes corados denomina-se mácula densa). A mácula densa é sensível ao conteúdo iônico e ao volume de água no fluido tubular, produzindo moléculas sinalizadoras que promovem a liberação da enzima renina na circulação. O primeiro segmento do néfron, o corpúsculo renal ou de Malpighi, é constituído por um tufo de capilares, o glomérulo, que é envolvido pela cápsula de Bowman. O glomérulo é um enovelado capilar formado a partir de subdivisões da arteríola aferente que, posteriormente, se unem formando a arteríola eferente. Esses capilares são envolvidos pela cápsula de Bowman, uma estrutura que tem forma de cálice, possuindo parede dupla entre as quais fica o espaço de Bowman, ocupado pelo filtrado glomerular. A parede externa da cápsula constitui o folheto parietal, e é formada por epitélio simples pavimentoso, sendo responsável pela manutenção da integridade da cápsula. A parede interna, o folheto visceral, é constituída pelos podócitos, capazes de fazer endocitose e participar da síntese e manutenção da membrana basal do glomérulo. Os podócitos estão sobre a membrana basal e são formados pelo corpo celular, de onde partem os prolongamentos primários e à medida que se diferenciam, estendem os mesmos ao redor dos

capilares e dão origem a inúmeros prolongamentos secundários denominados pedicelos, ambos envolvem completamente os capilares. Os pedicelos interdigitam-se com pedicelos de podócitos vizinhos, onde entre eles há espaços alongados, as fendas de filtração, que permitem que o ultrafiltrado do sangue entre na cápsula de Bowman. Os capilares glomerulares são do tipo fenestrado e, entre as células endoteliais e os podócitos, há uma membrana basal (Figura 2) (AIRES, 2008; CARNEIRO, 2017; JUNQUEIRA; RIELLA, 2003). A representação esquemática da ultraestrutura do capilar glomerular e do folheto visceral da cápsula de Bowman e corte histológico da camada cortical do rim são observados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Figura 3 – Representação esquemática da ultraestrutura do capilar glomerular e do folheto visceral da cápsula de Bowman

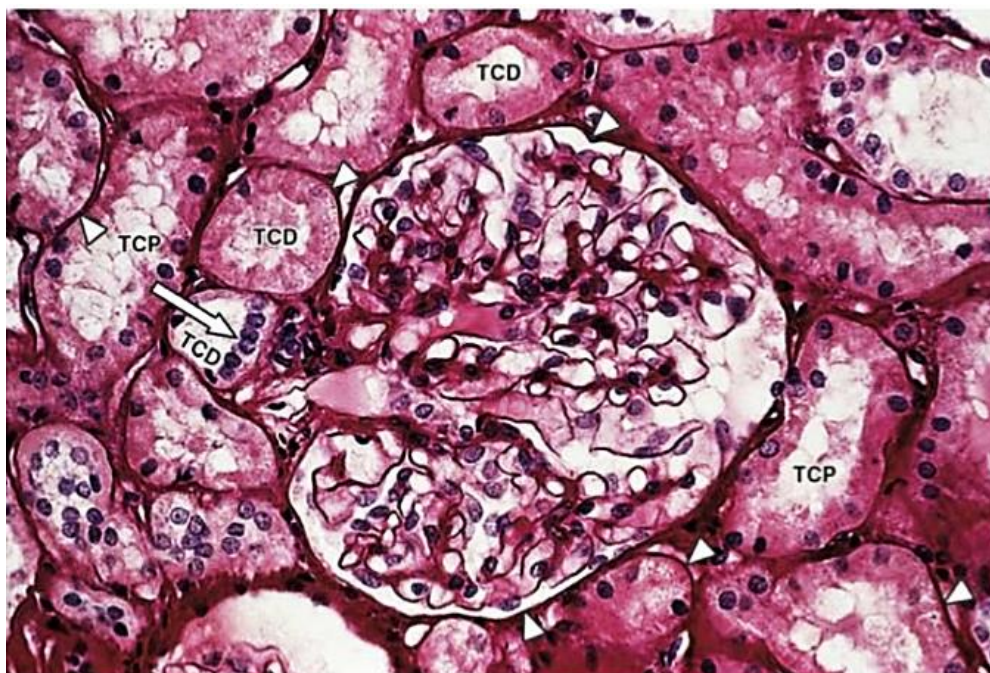


Nota: É constituído pelos podócitos com prolongamentos primários e secundários, formando a fenda de filtração.

Tanto os prolongamentos dos podócitos quanto o capilar fenestrado estão apoiados na membrana basal.

Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017.

Figura 4 – Fotomicrografia da camada cortical do rim pela Coloração de Picrosirius-Hematoxilina em médio aumento



Legenda: Túbulos Contorcidos Proximais (TCP), Túbulos Contorcidos Distais (TCD).

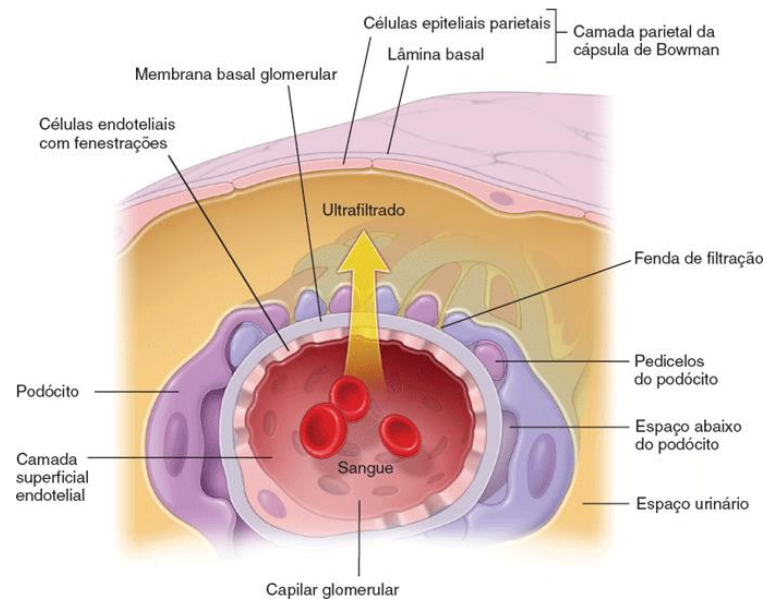
Nota: A fotomicrografia evidencia o corpúsculo renal, túbulos contorcidos proximais (TCP) e distais (TCD). A seta aponta a mácula densa do túbulo distal próximo ao polo vascular do corpúsculo renal do mesmo néfron.

A cabeça de seta aponta as membranas basais dos capilares glomerulares e dos túbulos renais.

Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017.

O plasma sanguíneo presente no lúmen dos capilares glomerulares enfrenta, passivamente, uma barreira de ultrafiltração até que alcance o lúmen da cápsula de Bowman como filtrado glomerular ou urina primitiva. Essa barreira de ultrafiltração possui três estruturas e são elas: células endoteliais fenestradas dos capilares, membrana basal glomerular (MBG) e podócitos com suas junções especializadas ou fenda diafragmática (PATRAKKA; TRYGGVASON, 2010; ROSS, 2018). Juntos, esses componentes impedem fisicamente (seleção por tamanho) e eletroquimicamente (repulsão de cargas) a saída de macromoléculas do sangue, garantindo a retenção de proteínas grandes no plasma, como a albumina (66 kDa) (ECKARDT *et al.*, 2013). Finalmente, o ultrafiltrado resultante, quase livre de proteínas, segue do lúmen da cápsula de Bowman para os túbulos renais para ajuste fino do que deve ou não ser excretado na urina. No túbulo proximal, a maior parte das proteínas de baixo peso molecular que ainda passou para o filtrado são reabsorvidas e assim apenas traços de proteínas são excretados na urina (BRIFFA *et al.*, 2013; ROSS, 2018) (Figuras 5 e 6).

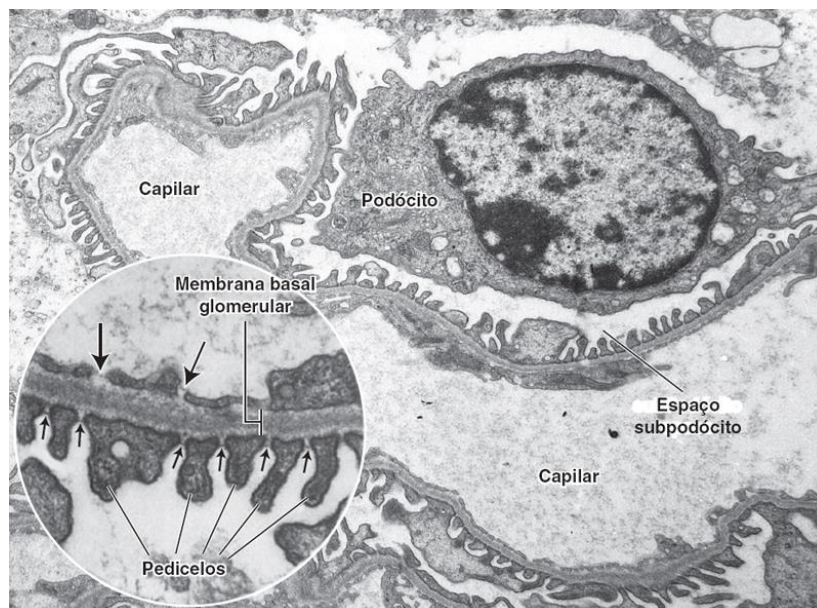
Figura 5 – Diagrama simplificado da barreira de filtração glomerular



Nota: Diagrama simplificado da barreira de filtração glomerular evidenciando o podócito sobre a MBG e seus prolongamentos secundários, os pedicelos, se interdigitando e formando as fendas de filtração. Abaixo da MBG está esquematizado o capilar glomerular formado por células endoteliais fenestradas.

Fonte: ROSS, 2018.

Figura 6 – Fotomicrografia da ultraestrutura do córtex renal observado no microscópio eletrônico de transmissão



Nota: Fotomicrografia da ultraestrutura do corpúsculo renal observado no microscópio eletrônico de transmissão evidenciando em menor aumento o podócito, os capilares fenestrados e o espaço subpodocitário. Em destaque observa-se a membrana basal glomerular e as fendas de filtração (setas) formadas pelas interdigitações dos pedicelos.

Fonte: ROSS, 2018.

Uma vez que a barreira de filtração sofre lesão ou aumenta sua permeabilidade, seja por danos em podócitos ou em seus outros componentes, ela perde a capacidade de selecionar adequadamente o conteúdo do filtrado, o que pode resultar em maior passagem de proteínas, como a albumina, caracterizando albuminúria, processo comum em doenças renais. A MBG, situada entre células endoteliais e podócitos, é uma lâmina basal espessa (300 a 370 nm), que resulta da fusão das membranas basais do endotélio e dos podócitos – as células da camada visceral da cápsula de Bowman. Em virtude de sua espessura, a membrana basal glomerular é vista como uma estrutura proeminente em cortes histológicos corados com o ácido periódico-Schiff (PAS), uma vez que é formada por uma "rede" de glicoproteínas e proteoglicanos, fornecendo a primeira estrutura de suporte ao tufo glomerular. A MBG é composta de uma rede que consiste em colágeno do tipo IV, laminina, nidogênio e entactina, juntamente com proteoglicanos de heparan sulfato, como a agrina e o perlecan, e glicoproteínas multiadesivas. As moléculas com carga elétrica negativa retêm moléculas carregadas positivamente, e o colágeno IV com a laminina constituem um filtro de macromoléculas, que atua como uma barreira física. Com isso, a MBG restringe o movimento das partículas, geralmente proteínas, com mais de aproximadamente 70.000 Da ou raio de 3,6 nm, como a albumina ou hemoglobina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; NAYLOR *et al.*, 2021; ROSS, 2018). O espessamento da MBG está associado à albuminúria, além de alteração da taxa de filtração glomerular (MARSHALL, 2016). Adicionalmente, os podócitos, intimamente associados aos capilares e à MBG, estão vulneráveis às mudanças metabólicas e pressões hemodinâmicas (ALGHAMDI *et al.*, 2017). A resposta dos podócitos à injúria é determinada por suas alterações moleculares e ultraestruturais. Dependendo da gravidade e da duração da injúria, as alterações nas funções dos podócitos podem evoluir para um quadro de alteração na filtração glomerular e albuminúria (MUNDEI; REISER, 2010; SHANKLAND, 2006).

Outro tipo celular presente nos glomérulos e intimamente associados à MBG são as células mesangiais, que produzem matriz mesangial extracelular fornecendo sustentação estrutural aos podócitos. Além disso, elas participam de mecanismos de fagocitose e da modulação da filtração glomerular, regulando o fluxo sanguíneo nos capilares glomerulares através de suas propriedades musculares de contração e relaxamento. A célula mesangial também produz citocinas, agentes vasoativos, sintetiza e degrada várias substâncias do tufo glomerular. Na matriz mesangial são encontrados glicosaminoglicanos sulfatados, laminina e fibronectina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; ROSS, 2018).

A obesidade pode levar a hipertrofia glomerular, onde os podócitos precisam cobrir uma área maior expandindo os processos podais. Se esse aumento não for proporcional à hipertrofia glomerular isso pode levar ao descolamento do podócito (WIGGINS, 2005). Em caso de persistência da injúria, o tecido normal acaba sendo substituído por tecido fibrótico, o que leva perda funcional da região afetada (KAISLING *et al.*, 2013).

Doença renal associada à obesidade

A obesidade não só está fortemente associada as duas principais causas de DRC, hipertensão e diabetes, mas também é um fator de risco independente para o próprio desenvolvimento da DRC e doença renal em estágio terminal. Evidências sugerem que, em geral, o aumento do risco de DRC cresce com o aumento do IMC (MOUNT *et al.*, 2015; WICKMAN; KRAMER, 2013; DE VRIES *et al.*, 2014).

O mecanismo exato pelo qual a obesidade leva à doença renal ainda não foi completamente elucidado. Entretanto, associado ao acúmulo lipídico no rim, dados na literatura apontam como principais causas a hiperglicemia e hipertensão. Essas alterações patológicas nas doenças renais relacionadas à obesidade são promovidas pelo estresse oxidativo e inflamação. O acúmulo crônico de energia causa um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio geradas e seu sistema de defesa, levando ao estresse oxidativo excessivo (MOUNT *et al.*, 2015). Durante esse processo, há superativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), na tentativa de equilibrar a função renal alterada pela inflamação (RUSTER *et al.*, 2013).

Dados indicam que as alterações renais geradas pela obesidade ocorrem principalmente como consequência do desbalanço entre a lipólise e a lipogênese, gerando um acúmulo de lipídeos no rim. O excesso de lipídeos pode causar lipotoxicidade desencadeando um processo inflamatório e/ou perda da função do órgão (EO *et al.*, 2017). Além disso, a demanda metabólica exigida com o aumento da massa corporal (MC) pode levar ao processo de lesão tubular, hiperfiltração e aumento da pressão intraglomerular, culminando no risco de lesão renal (KOVESDY *et al.*, 2006). O acúmulo de lipídeos pode ser observado em células mesangiais, podócitos e células epiteliais do túbulo proximal, essas últimas parecem ser particularmente mais susceptíveis ao dano pela desregulação do metabolismo lipídico normal uma vez que a

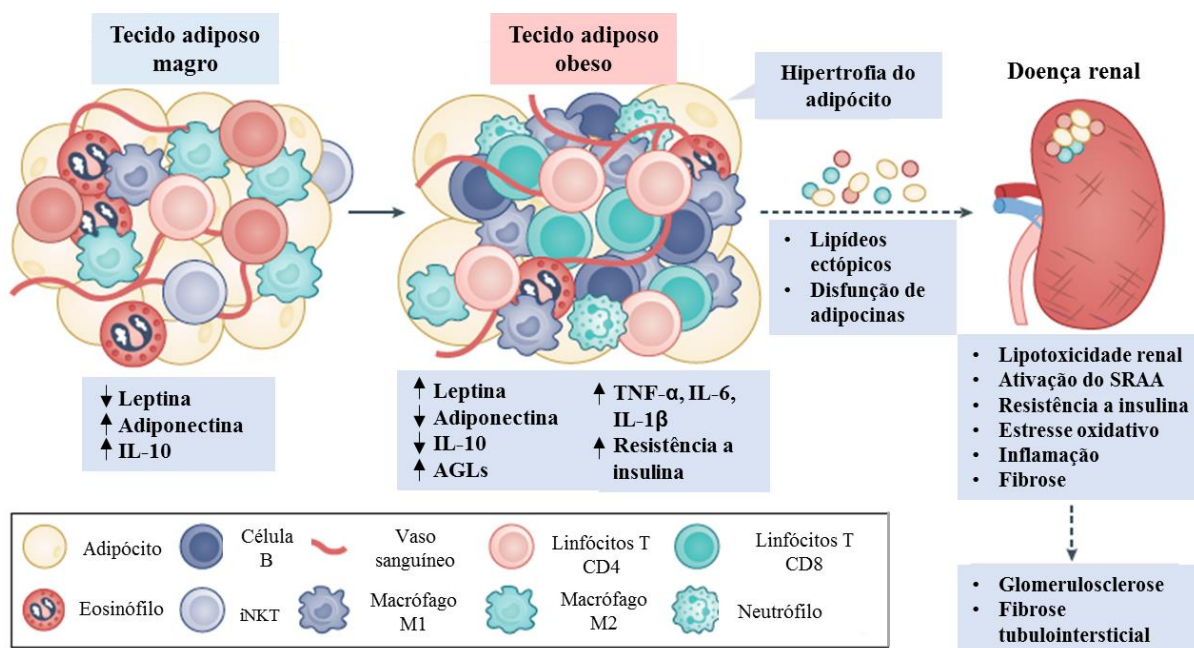
maior fonte de energia provém da β -oxidação dos AGs (BOBULESCU, 2010; YAMAMOTO *et al.*, 2016).

A homeostase dos AGs é regulada por uma complexa interação, com a captação de AGs não-esterificados (ou AGs livres) do plasma e AGs *de novo* e a β -oxidação de AGs e exportação via lipoproteínas (BOBULESCU, 2010; YANG *et al.*, 2017). A esteatose renal ocorre quando a taxa de entrada de AGs (captação e síntese) excede a taxa de saída (oxidação e secreção) (POSTIC; GIRARD, 2008; YANG *et al.*, 2017). Estudos em animais alimentados com dieta hiperlipídica (HL) demonstraram que o metabolismo lipídico renal alterado culmina no acúmulo de AGs em forma de TG (3 moléculas de AGs esterificados com glicerol) causado por diminuição de enzimas de oxidação de AGs e aumento de enzimas envolvidas na lipogênese (KUME *et al.*, 2007).

No contexto da ingestão excessiva de calorias, a capacidade do corpo de armazenar gordura no tecido adiposo é excedida e ocorre o acúmulo de lipídios ectópicos em vários órgãos. Acumulação lipídica ectópica refere-se ao acúmulo de gordura em tecidos não adiposos como músculo, fígado, rins e pâncreas resultante de uma ingestão de energia que excede gradualmente a capacidade do corpo de armazenar gordura no tecido adiposo branco (GAI *et al.*, 2019). Essa situação é caracterizada por hipertrofia de adipócitos, resistência à insulina, desregulação de citocinas e adipocinas inflamatórias e recrutamento de macrófagos M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório), assim como outras células imunes, como os linfócitos CD4⁺ (T-helper) e CD8⁺ (T-citotóxicas) para o tecido adiposo inflamado. As células T citotóxicas CD8⁺ são conhecidas por se acumular e proliferar no tecido adiposo obeso, contribuindo assim para a inflamação local e sistêmica e disfunção metabólica do tecido adiposo (NISHIMURA *et al.*, 2009; TALUKDAR *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2007). Populações distintas de células imunes, incluindo eosinófilos, macrófagos M2 reparadores, células linfoides inatas tipo 2, células T “natural killer” invariantes (iNKT), células B e células T reguladoras, atuam para neutralizar esses efeitos pró-inflamatórios. Essas células residem no tecido adiposo em condições normais, mas são reduzidas no tecido adiposo obeso (MOLOFSKY *et al.*, 2013; NISHIMURA *et al.*, 2013; WANG; WU, 2018). A leptina derivada do tecido adiposo juntamente com citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-6 e IL-1 β são responsáveis por estimular as vias de sinalização pró-inflamatórias em vários órgãos, incluindo os rins (KAMEI *et al.*, 2006; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003). A lipotoxicidade renal ocorre em todas as principais populações de células renais, incluindo células mesangiais, podócitos e células epiteliais do túbulo proximal. O acúmulo de lipídios no rim é mediado pela ativação de

múltiplas vias inflamatórias e sinalização de TGF- β . A carga geral de efeitos lipotóxicos causados pelo acúmulo ectópico de lipídios e adipocinas no rim resulta em estresse oxidativo, ativação do SRAA, inflamação e fibrose, levando a danos nos compartimentos glomerular e tubular (BRENNAN *et al.*, 2021; DE VRIES *et al.*, 2014; GAI *et al.*, 2019) (Figura 7).

Figura 7 – Representação da associação entre acumulação lipídica ectópica e a doença renal



Fonte: Adaptada de BRENNAN *et al.*, 2021.

Diversos estudos em modelos animais de obesidade induzida por dieta HL têm demonstrado que o acúmulo ectópico de lipídeos está envolvido nas mudanças estruturais e funcionais das células renais (DE VRIES *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2005; DEJI *et al.*, 2008; BOBULESCU *et al.*, 2010; KUME *et al.*, 2007; BRENNAN *et al.*, 2021; ESQUINAS *et al.*, 2020). Camundongos alimentados com dieta HL apresentaram um quadro de albuminúria e alterações fisiopatológicas renais, como o acúmulo lipídico, aumento na deposição de colágeno tipo IV nos glomérulos e infiltração de macrófagos na medula renal, glomerulomegalia, expansão de matriz mesangial, espessamento da MBG, glomeruloesclerose, aumento de moléculas fibróticas, como o ativador de plasminogênio tipo 1 e fator de crescimento endotelial vascular (DEJI *et al.*, 2008; FANG *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2005; MIN *et al.*, 2014;).

Além disso, Bobulescu *et al.* (2014) mostraram pela primeira vez, em humanos, que a obesidade está associada com aumento do acúmulo de TG, por exemplo, predominantemente nas células tubulares renais. No mesmo ano, Herman-Edelstein *et al.* observaram metabolismo

lipídico alterado e acúmulo de lipídeos no rim de humanos com nefropatia diabética, com vias de β -oxidação de AGs menos ativas. Kang *et al.* (2015) também observaram oxidação defeituosa de AGs e acúmulo de lipídeos em células tubulares fibróticas de humanos.

A via final comum de dano renal frequentemente envolve inflamação e fibrose. Por isso, terapias que podem atuar no processo inflamatório, como AGs poli-insaturados (PUFAs) ômega-3 são consideradas promissoras. Estudos experimentais usando uma variedade de modelos mostraram efeitos benéficos de PUFAs ômega-3 (AN *et al.*, 2009; HIRAHASHI 2017; LIN *et al.*, 2022; YAMAMOTO *et al.*, 2021; ZANETTI *et al.*, 2017).

Ácidos graxos poliinsaturados

Atualmente, a forma mais eficaz tanto para o tratamento da obesidade, quanto das alterações sistêmicas e locais que ela possa acarretar, envolvem modificações no estilo de vida e na dieta de pacientes com essas morbidades. A prática de atividades físicas e a alimentação saudável geram benefícios significativos no tratamento da obesidade. Entretanto, só uma pequena porcentagem desses pacientes consegue implementar essas medidas de forma a se tornarem eficaz (FRAULOB *et al.*, 2012). Assim, a busca de novas opções terapêuticas, entre elas opções farmacológicas vêm crescendo cada vez mais, sendo a utilização de PUFAs uma alternativa promissora (MATRAVADIA *et al.*, 2014).

Os AGs são ácidos carboxílicos caracterizados por apresentar longa cadeia de hidrocarbonetos com um grupo carboxila e um grupo metila em cada uma de suas extremidades (ALBRACHT-SCHULTE *et al.*, 2018). 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 duas ou mais ligações, insaturados (RUXTON *et al.*, 2004). Os AGs mais comuns e os adquiridos pela dieta são principalmente na forma de TG e são armazenados para reserva energética, transformados em hormônios, transportadores, mensageiros celulares e constituintes da membrana celular (ALBERTS *et al.*, 2004; LEHNINGER *et al.*, 2018).

Existem três importantes séries de PUFAs: ômega 3 (n-3), ômega 6 (n-6) e ômega 9 (n-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 (SALA-VILA *et al.*,

2008). As séries n-6 e n-3 não podem ser sintetizados pelos animais e humanos e devem ser supridos pela dieta (KAPOOR *et al.*, 2021). A biossíntese dos PUFAs n-3 e n-6 compartilham a mesma enzima desaturase, e, portanto, competem pela mesma via metabólica (RUXTON *et al.*, 2004). No entanto, as desaturasas têm maior afinidade pelos n-3. A série n-6 é derivada do Ácido Linoléico (AL) e a série n-3, do Ácido Alfa-Linolênico (ALN). A partir destes PUFAs, são sintetizados os ácidos Araquidônico (AA), pelo metabolismo de n-6, e Eicosapentanoico (EPA), Docosapentanoico (DPA) e Docosaexanoico (DHA), pelo metabolismo de n-3 (KAPOOR *et al.*, 2021; PERINI, 2010).

O AA, derivado do AL, é encontrado nas carnes e vísceras e óleos vegetais como soja e girassol. Já os derivados do ALN (EPA, DPA e DHA) estão presentes nos peixes, especialmente nos peixes mais gordurosos, como tuna, salmão, sardinha e carapau, assim como nos vegetais de folhas verdes escuras e sementes da planta – como chia, linhaça e nozes. A porção de um destes peixes pode prover entre 1,5 a 3,5g destes PUFAs n-3. O óleo de peixe disponível comercialmente apresenta esses PUFAs numa proporção de cerca 30% do total de lipídeos, de forma que uma cápsula contendo 1g de óleo de peixe normalmente provém aproximadamente 300 mg de PUFAs n-3 (SALA-VILA *et al.*, 2008; KAPOOR *et al.*, 2021).

Os PUFAs são essenciais para o indivíduo e atuam como precursores para a produção de mediadores lipídicos. Esses mediadores, como resolvinas e lipoxinas, possuem características anti-inflamatórias, como a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, a ativação de fatores de transcrição e o recrutamento de macrófagos, além de modular a liberação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (MOLFINO *et al.*, 2017).

Os PUFAs são importantes também para a funcionalidade normal dos rins. O AA, derivado do metabolismo de n-6, está envolvido no desenvolvimento e manutenção das funções renais normais. A molécula ativa prostaglandina (PG) é produzida a partir de AA por enzimas como a ciclooxigenase (COX). As PGs ajustam o fluxo sanguíneo para os rins, a quantidade de água corporal e o equilíbrio da concentração de sódio (KATAKURA *et al.*, 2015). O DHA e o EPA, PUFAs n-3, protegem contra insuficiência renal aguda isquêmica (KIELAR *et al.*, 2003), nefrotoxicidade (ABD-ELLAH, 2011; JIA *et al.*, 2004; MARIEE; THAKKAR *et al.*, 2000; PARINYASIRI *et al.*, 2004) e nefropatias diabéticas do tipo 1 (TANEDA *et al.*, 2010) e tipo 2 em roedores (BAYS, 2006; CHIN *et al.*, 2009; GARMAN *et al.*, 2009; KATAKURA *et al.*, 2014). Esses tipos de insuficiência renal estão intimamente relacionados à inflamação, assim como na obesidade, e promovem a perda da função renal (KATAKURA *et al.*, 2015). EPA e DHA também mostraram efeitos benéficos na diminuição do risco de síndromes

cardiovasculares e prevenção do progresso da resistência à insulina e da obesidade (Flachs *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos têm estudado a eficácia das fontes de PUFA para o tratamento da obesidade e de doenças associadas a ela, como as doenças renais e suas consequências. Em estudo anterior com camundongos obesos foi verificado que a lipoxina é capaz de atenuar o processo inflamatório renal, reduzindo a albuminúria, a produção de radicais livres e a deposição de colágeno tubulointersticial (BÖRGESON *et al.*, 2015). Além disso, Muramatsu *et al.* (2021) observaram que os níveis de espécies reativas de oxigênio no rim diminuíram com a ingestão de AA e DHA em 16 semanas após indução de nefrectomia em modelo experimental. Estudos apontam que a combinação de uma dieta rica em nutrientes e níveis significantes de PUFA n-3 e n-6 emergem como parte de uma estratégia equilibrada para o tratamento da hipertensão (DEMARCO, *et al.*, 2014).

Atualmente, a suplementação mais utilizada de PUFA é com óleo de peixe (GO *et al.*, 2016; INNES; CALDER, 2020). Entretanto, essa e outras fontes mais comuns de extração vegetal ou animal possuem um processo complexo para sua obtenção e geram pequena quantidade de produto final (PANAHI *et al.*, 2016). Logo, fontes alternativas de obtenção desses PUFA, como o óleo de capivara, seriam de extrema importância no cenário atual.

Óleo de capivara

A capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) está amplamente distribuída na América do Sul e é o maior roedor existente, sendo o consumo de sua carne um costume cultural em países como Venezuela e Brasil. Ela possui grande potencial econômico devido não só a sua carne, mas também ao seu couro e óleo (FEDERICO; CANZIANI, 2005; GIRARDI *et al.*, 2005). O Brasil possui locais licenciados pelo IBAMA para criação de capivaras, sendo um deles a Fazenda Santa Luzia (Goiás, Brasil), que é um criadouro destinado a carnes de caça, onde apesar de haver o aproveitamento de várias partes do animal, a gordura é geralmente desprezada.

Os estudos com o óleo de capivara ainda são limitados na literatura. No entanto, trabalhos anteriores observaram que o óleo extraído da gordura da capivara contém 19,6% de AGs linoleico e 17,9% de alfa-linolênico, que correspondem aos AGs essenciais n-6 e n-3

respectivamente (FUKUSHIMA *et al.*, 1997). Além disso, o óleo também é constituído por AGs oleico (35,6 a 39,8%) e palmítico (20,7% a 24,3%) (PINHEIRO *et al.*, 2001). O óleo de capivara é um dos componentes do Capivarol, com indicação de propriedades que auxiliam em doenças respiratórias como bronquite, asma e reumatismo (PINHEIRO, 2008), além de ser utilizado como remédio tradicional da dieta no Paraguai (FUKUSHIMA, *et al.*, 1997).

Poucos trabalhos investigaram sobre os efeitos do óleo de capivara. Porém, Fukushima *et al.* (1997) observaram que o óleo reduz a concentração de colesterol total (CT) e os níveis sanguíneos de VLDL, lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) em ratos alimentados com dieta rica em colesterol, quando comparados com outros óleos de origem animal. Além disso, dados do nosso grupo demonstraram que o mesmo é capaz de acelerar o processo de cicatrização em feridas cutâneas de ratos (MARINHO *et al.*, 2013) e melhorar a esteatose, inflamação e a atividade mitocondrial hepática (MARINHO *et al.*, 2018). Sendo assim, o óleo de capivara se apresenta como uma alternativa promissora de PUFA's para estudo, além de possibilitar a extração em grandes quantidades em um custo reduzido, se tornando uma alternativa sustentável.

Os efeitos do óleo de capivara estão associados aos seus AGs n-3 de raro balanço, o que dá uma luz sobre a necessidade de estudos do seu possível uso como nutracêutico (PINHEIRO, 2008). Os PUFA's podem fornecer grandes benefícios à saúde, entretanto são facilmente oxidados quando em contato com o oxigênio, o que compromete a suplementação requerida pelo indivíduo (SHUKLA; PERKINS, 1991). Uma forma de evitar essa oxidação e aumentar a biodisponibilidade dos PUFA's é a nanotecnologia farmacêutica, que surgiu nas últimas décadas (ESQUERDO *et al.*, 2015).

Nanotecnologia farmacêutica e Nanoemulsões

A nanotecnologia é focada em caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas na escala nanométrica (SAHOO *et al.*, 2007). Nos últimos 30 anos, a nanotecnologia farmacêutica vem crescendo exponencialmente, possibilitando inovações desafiadoras para o ramo da farmacologia. Essa nova tecnologia revoluciona o processo de entrega dos compostos biologicamente ativos e pode ser aplicável em diversas áreas da saúde (COUVREUR; VAUTHIER, 2006).

A nanotecnologia pode ser definida como o estudo e o controle de materiais em dimensões menores do que 1000 nm. O emprego da nanotecnologia tem levado a abordagens inovadoras em diversas áreas da saúde, sendo crescente a sua participação no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, com grande potencial de aplicação na liberação controlada de fármacos (HOET *et al.*, 2004; COUVREUR; VAUTHIER, 2006). A redução do tamanho de partícula e a produção de novos sistemas em escala nanométrica confere propriedades importantes e diferenciadas a estes nanossistemas frente aos sistemas convencionais já conhecidos. O emprego da nanotecnologia na área farmacêutica promove uma liberação controlada e visa a vetorização a alvos específicos no organismo, o que possibilita uma redução de dose com consequente diminuição dos efeitos adversos, redução na toxicidade e uma maior adesão do paciente à terapêutica (FARAJI; WIPF, 2009). Este aspecto é extremamente relevante no caso de doenças crônicas onde, na maioria das vezes, o tratamento é prolongado. Além disso, a nanotecnologia pode auxiliar na veiculação de compostos lipofílicos, proteção da degradação, aumento da estabilidade e biodisponibilidade de fármacos (COUVREUR *et al.*, 2002).

Apesar de ser considerada uma tecnologia recente, diversos estudos apontam para a vantagem da utilização de compostos nanoencapsulados ou nanoparticulados, como redução da dose do medicamento e melhor absorção do fármaco (D'ALMEIDA *et al.*, 2017; ESQUERDO *et al.*, 2015). Dependendo da estrutura e composição das nanopartículas, estas apresentam propriedades físico-químicas específicas e diferentes possibilidades de aplicações. Entre as diversas classes de materiais empregadas com a finalidade de entrega de fármacos, os sistemas coloidais baseados em polímeros têm atraído muita atenção devido à flexibilidade oferecida pelos métodos de síntese macromolecular, diversidade quase infinita dos polímeros em termos de natureza, propriedades e composição, além de sua facilidade de funcionalização (ZHANG *et al.*, 2011; ELSABAHY; WOOLEY, 2012; KAMALY *et al.*, 2012). Dessa forma, a produção de sistemas coloidais a base de polímeros representa uma das mais promissoras oportunidades para o tratamento de diversas doenças.

A composição e estrutura de nanossistemas apresentam propriedades físico-químicas específicas e diversas possibilidades diferentes de aplicações. As diversas opções de materiais empregados com a finalidade de entrega de fármacos incluem nanopartículas lipídicas sólidas, nanocápsulas, nanocompósitos para a embalagem dos alimentos ou nanoemulsões (Jee *et al.*, 2006). As nanoemulsões apresentam maior razão entre a área e o volume de superfície, maior estabilidade em relação ao índice de polidispersão e à agregação (CHEN; INBARAJ, 2019).

As nanoemulsões são, então, uma excelente escolha para o encapsulamento e entrega de fármacos, podendo carrear tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas. A grande área interfacial entre o óleo e a água pode melhorar a solubilidade dos ativos e, também, modificar adsorção e biodisponibilidade (MCCLEMENTS, 2013; SANTANA *et al.*, 2013). Sendo assim, a produção de nanoemulsões contendo óleo de capivara pode possibilitar um aumento da biodisponibilidade de PUFA's, caracterizando uma oportunidade promissora para o tratamento de diversas doenças, incluindo a doença renal decorrente de alteração metabólica.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos do óleo de capivara livre ou em nanoemulsão nos parâmetros morfológicos bioquímicos e fisiológicos renais de camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta controle ou hiperlipídica.

1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- a) caracterizar físico-quimicamente o óleo de capivara;
- b) desenvolver e caracterizar físico-quimicamente nanoemulsão contendo óleo de capivara;
- c) avaliar os efeitos da administração do óleo de capivara livre e em nanoemulsão em camundongos obesos no (a):
 - massa corporal, pressão arterial e níveis de glicose no sangue;
 - bioquímica plasmática com avaliação do CT, HDL, LDL, VLDL, TG, creatinina e ureia;
 - bioquímica urinária com análise de creatinina, ureia e proteínas urinárias para avaliação do comprometimento da função renal;
 - morfologia estrutural do córtex renal;
 - morfologia ultraestrutural do córtex renal;
 - atividade de enzimas antioxidantes implicadas no estresse oxidativo do rim; e
 - remodelamento e processo inflamatório e fibrótico do córtex renal.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do óleo de capivara e produção da nanoemulsão

A gordura subcutânea da capivara foi adquirida do Criadouro de Animais Silvestres e Exóticos Fazenda Santa Luzia (Itaberaí, Goiás, Brasil), que possui autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para criação e comercialização de carnes de animais exóticos. A extração do óleo foi realizada através do processamento hidrotérmico da gordura em banho-maria, obtendo-se o óleo em sua forma líquida (MARINHO, *et al.*, 2013) para sua posterior administração oral nos animais, via gavagem orogástrica.

Parte do óleo foi separado e enviado para a Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) para a realização das análises físico-químicas e produção das nanoemulsões pela professora Dra. Stela Regina Ferrarini no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica.

Para o preparo das suspensões de nanoemulsões contendo o óleo de capivara foram utilizadas formulações preparadas por emulsificação espontânea. O monoestearado de sorbitano e o óleo de capivara (componentes da fase orgânica) (1 mg/ mL) foram dissolvidos sob agitação magnética a 40°C em acetona e injetados na fase aquosa (polissorbato 80 e água), sob agitação e permanecendo nesta condição por 10 min. Logo em sequência, a formulação foi concentrada a um volume final de 10 mL em evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e de parte da água. A nanoemulsão branca foi preparada sem a adição do óleo de capivara, sendo este substituído por um óleo inerte, TG de cadeia média (JÄGER *et al.*, 2009). Na caracterização físico-química das formulações em cada lote de formulação foi determinado o tamanho das partículas e o índice de polidispersão através do espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer® ZS, Malvern, Reino Unido). A confirmação dos parâmetros e o monitoramento do movimento browniano das suspensões foi realizado através do equipamento NanoSight® (Amesbury, Reino Unido). O potencial zeta foi determinado pelo princípio de mobilidade eletroforética de sistemas coloidais utilizando-se o Zetasizer®. O pH foi determinado em potenciômetro e a morfologia das nanoemulsões por microscopia eletrônica de transmissão. A determinação da concentração do óleo de capivara em nanoemulsão foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). E na determinação do tempo máximo que as

suspensões poderão ser utilizadas para os experimentos biológicos sem apresentar nenhum fenômeno de instabilidade física, foi utilizada a metodologia de espalhamento múltiplo de luz através do Turbiscan LAb® (Formulaction Co., França).

2.2 Animais e dieta

Os procedimentos foram realizados de acordo com as guias convencionais para experimentação em animais. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (n.º CEUA/031/2018) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Neste trabalho, foram utilizados 60 camundongos C57Bl/6 machos, com 3 meses de idade, pesando em média 26 g. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE) na UERJ sob condições controladas (temperatura 21 ± 2 °C, umidade $60 \pm 10\%$, ciclo de luz invertido de 12 h – claro/ escuro e ciclo de reposição de ar 15 min/h) e receberam dieta controle ou HL e água filtrada durante todo o experimento, de acordo com os grupos experimentais. As dietas foram escolhidas de acordo com a AIN93-M (Reeves *et al.*, 1993) e manipuladas pela empresa Pragsoluções Biociências (São Paulo, Brasil). As composições detalhadas das dietas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2- Composição e conteúdo energético das dietas controle e hiperlipídica (dietas à base de AIN-93M)

Nutrientes (g/ kg)	Dieta Controle	Dieta hiperlipídica
Caseína	140	190
Amido de milho	620,69	250,68
Sacarose	100	100
Banha de porco	0	320
Óleo de soja	40	40
Fibras	50	50
Mix Vitaminas*	10	10
Mix Minerais*	35	35
L-Cystine	1.8	1.8
Choline	2.5	2.5
Antioxidante	0,008	0,016
Total (g)	1000	1000
Energia (kcal/kg)	3573	5404
Carboidratos (% energia)	76	26
Proteína (% energia)	14	14
Lipídeos (% energia)	10	60

Legenda: * Vitaminas e minerais presentes no mix estão de acordo com a AIN93-M.

Fonte: A autora, 2023.

O desenho experimental teve a duração total de 18 semanas (Figura 8). Os animais receberam 4g/ dia de dieta controle (C) ou hiperlipídica (HL) durante todo o período experimental. Sendo assim, os 60 animais foram inicialmente divididos em dois grupos: 30 animais foram alocados no grupo denominado Controle (C) e os outros 30 no grupo denominado Hiperlipídico (HL).

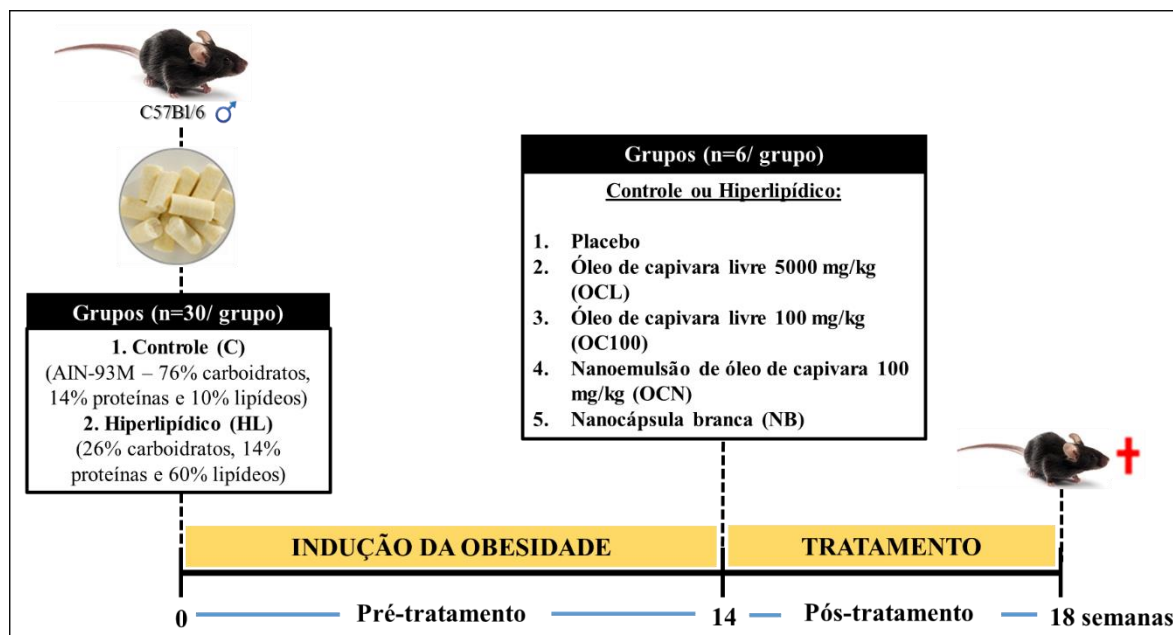
Transcorridas 14 semanas, esses dois grupos foram então subdivididos, formando dez grupos (descritos mais adiante). Da 15^a até a 18^a semana de experimento, os dez subgrupos receberam óleo de capivara em sua forma livre (5000 mg/ kg/ dia ou 100 mg/ kg), nanoemulsão de óleo de capivara (100 mg/ kg) ou placebo (água filtrada) para que tivessem o mesmo tipo de influência durante a manipulação. A administração do óleo livre, nanoemulsão ou placebo se deu via gavagem orogástrica, diariamente.

Para fins de entendimento, o período compreendido até a 14ª semana foi denominado pré-tratamento e o período compreendido entre a 15ª até a 18ª semana foi denominado pós-tratamento.

Os 10 subgrupos (n= 6/ grupo) são detalhadamente explicados a seguir:

- a) C: Camundongos receberam dieta controle e placebo;
- b) C + OCL: Camundongos receberam dieta controle e óleo de capivara livre na dose de 5000 mg/ Kg;
- c) C + OC 100: Camundongos receberam dieta controle e óleo de capivara livre na dose de 100 mg/ Kg;
- d) C + OCN: Camundongos receberam dieta controle e nanoemulsão contendo óleo de capivara na dose de 100 mg/ Kg;
- e) C + NB: Camundongos receberam dieta controle e nanoemulsão sem o princípio ativo;
- f) HL: Camundongos receberam dieta hiperlipídica e placebo;
- g) HL + OCL: Camundongos receberam dieta hiperlipídica e óleo de capivara livre na dose de 5000 mg/ Kg;
- h) HL+ OC 100: Camundongos receberam dieta hiperlipídica e óleo de capivara livre na dose de 100 mg/ Kg;
- i) HL + OCN: Camundongos receberam dieta hiperlipídica e nanoemulsão contendo óleo de capivara na dose de 100 mg/ Kg;
- j) HL + NB: Camundongos receberam dieta hiperlipídica e nanoemulsão sem o princípio ativo.

Figura 8 – Desenho experimental



Fonte: A autora, 2023.

2.3 Massa corporal e pressão arterial sistólica

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada mensalmente no período pré-tratamento e quinzenalmente no período pós-tratamento através do método não invasivo da pletismografia da artéria caudal (Kent Scientific, EUA) em todos os grupos experimentais, com os animais conscientes, a partir da semana zero (antes da ingestão da dieta) até o fim do experimento (semana dezoito). Todos os animais foram aclimatados durante duas semanas, antes do período experimental, para minimizar o estresse durante as aferições da PAS. As aferições foram feitas por meio de um garrote e de um sensor de pulso colocados em torno da cauda de cada animal. Estes foram conectados ao registrador, o qual insufla e exsufla automaticamente o garrote, e detecta o desaparecimento e o aparecimento da onda de pulso na artéria caudal determinando, assim, a PAS. A média de três aferições de cada animal foi utilizada.

A MC foi verificada semanalmente durante todo o experimento, em balança digital de precisão (0,01g). A evolução da MC dos camundongos no decorrer das semanas foi calculada e traçada.

2.4 Teste oral de tolerância à glicose

A fim de avaliar a tolerância à glicose, o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado no início do experimento (para verificar a normalidade da amostra). O teste foi realizado mensalmente após a ingestão da dieta, tanto no período pré-tratamento, quanto no pós-tratamento. Para tal procedimento foi verificada a glicose de jejum; em seguida foi administrada por gavagem a solução de glicose a 25% (2g/ kg/ animal), e então nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos a glicose foi novamente aferida.

Nos dias de aferição os animais permaneceram em jejum de oito horas. O sangue foi coletado através de uma incisão pequena na ponta da cauda do camundongo, e a concentração de glicose plasmática foi medida (glicosímetro Breeze 2, Bayer).

2.5 Excreção urinária, eutanásia e obtenção das amostras de sangue e teciduais

Na 18ª semana de experimentação, 24 h antes da eutanásia, os animais de todos os grupos experimentais foram colocados em gaiolas metabólicas (n=3/ grupo) e a urina de 24 h foi coletada.

No dia da eutanásia, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital (40 mg/ kg), intraperitonealmente. Através de incisão mediana (na linha alba), o abdômen e tórax foram expostos. As amostras de sangue foram extraídas por punção cardíaca e colocadas em tubos previamente heparinizados (0,1 ml), sendo imediatamente centrifugado a 819 x g por 10 min, à temperatura ambiente. O plasma foi armazenado em refrigeração a -20°C para posteriores análises.

Em seguida, os rins foram cuidadosamente dissecados, clivados e fixados em paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% ou congelados a -80°C.

2.6 Bioquímica plasmática e urinária

A partir do plasma extraído do sangue de cada animal, foi possível a realização das análises bioquímicas. Foi feita a dosagem dos níveis de creatinina, ureia, TG, CT, HDL, LDL e VLDL.

Além disso, a fim de avaliar a função renal, foram feitas dosagens urinárias dos níveis de creatinina, ureia e proteínas urinárias.

As análises do plasma e urina foram realizadas por espectrofotometria, de acordo com as especificações do fabricante (Bioclin System II, MG, Brasil).

2.7 Histoquímica e Imunohistoquímica

As amostras de rins fixados em paraformaldeído 4% foram clivadas com bisturi longitudinalmente e lavadas por 2 h em água corrente. Após a lavagem, as amostras teciduais foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, 70% (*overnight*), 90%, 100% (2x), por 1 h em cada etapa. Posteriormente, o material foi clarificado através de dois banhos de xilol, sendo 20 min em cada. Em seguida, os fragmentos de rins foram inseridos duas vezes em parafina (Proquimios, Brasil) a 60 °C por 30 min em cada etapa e incluídos na mesma. Todos os fragmentos incluídos em parafina foram seccionados em 5 µm de espessura em micrótomo (American Optical, modelo Spencer, Estados Unidos). As secções foram desparafinadas em estufa a 60 °C por 5 min e os cortes foram hidratados, como a seguir: 2 banhos de xilol, álcool 100%, 90%, 70% e água destilada, por 2 min em cada etapa.

Para histoquímica, as lâminas foram coradas pelos métodos de Hematoxilina-Eosina e Ácido Periódico Schiff. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e diafanizados em concentrações crescentes de álcool, 70%, 90%, 100% e xilol. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Alemanha) e lamínulas e visualizadas ao microscópio óptico.

Para realização da técnica de imunohistoquímica, foram utilizadas lâminas histológicas revestidas com silano (Sigma-Aldrich, USA). Inicialmente, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada utilizando peróxido de hidrogênio a 3%, por 15 min e os cortes foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) 3 vezes, por 5 min cada vez. As lâminas foram submetidas à

recuperação antigênica com tampão citrato, pH 6,0, por 20 min a 60 °C. Em seguida, os cortes foram lavados novamente com PBS e marcações inespecíficas dos anticorpos foram bloqueadas através da incubação em PBS/BSA (soroalbumina bovina) 3%, por 20 min, em temperatura ambiente. Os cortes foram, então, incubados com os anticorpos primários TNF- α , TGF- β , IL-10 e α -SMA (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) diluídos em PBS (proporção 1:100) em câmara úmida *overnight* a 10 °C. No dia seguinte, os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário biotinizado, por 1 h, e, posteriormente, com a estreptavidina (Dako, Estados Unidos), por 30 min, em temperatura ambiente. Após lavagens com PBS, os produtos da imunorreação foram visualizados usando o reagente diaminobenzidina (DAB) (Dako, Estados Unidos) e contracolorados com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram então hidratadas em concentrações crescentes de álcool, 70%, 90%, 100% e xilol e montadas com Entellan e lamínulas para posterior observação ao microscópio óptico. O controle negativo da reação foi obtido omitindo a etapa de incubação do anticorpo primário.

Para quantificação da expressão das substâncias citadas acima, foi utilizado o software Image-Pro Plus versão 7.0. Para tal, foram analisados 10 campos aleatórios de cada lâmina, ao microscópio óptico (Olympus BX53 com câmera Olympus DP72 acoplada, Japão).

2.8 Estresse oxidativo

Fragmentos de rim congelados a -80°C foram homogeneizados para realização do ensaio enzimático de estresse oxidativo em tampão KPE, como realizado por Kennedy-Feitosa *et al.* (2016). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi verificada através do monitoramento da inibição da auto-oxidação de adrenalina (Sigma-Aldrich, USA) em 480 nm. A análise da atividade da enzima catalase (CAT) foi feita através da mensuração da taxa de diminuição de peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich, USA), com concentrações mensuradas em 240 nm.

2.9 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras teciduais foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, a 4°C por 24 h. O material foi clivado e lavado 3 vezes por 10 min em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e incubado em tetróxido de ósmio 1% por 1 h. Após as lavagens, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por 30 min em cada fase. Posteriormente, o material foi infiltrado com acetona e resina Epon (TedPella, Estados Unidos) [25mL de Epon 812, 17 mL de anidrido metil nádico (MNA), 8 mL de anidrido dodecenil succínico (DDSA), 32 gotas de 2,4, tridimetilaminametilfenol (DMP) nas proporções de 2:1 por 2 h, 1:1 por 2 h e 1:2 por 2 h]. No dia seguinte, o material foi inserido em resina epon pura, em tubos abertos por 4 h, e posteriormente incluído em nova resina epon, polimerizada em estufa, a 60 °C, por 3 dias.

Em seguida, foram realizados cortes ultrafinos (60-70 nm) de áreas selecionadas com ultramicrotomo (Leica Ultracut-UCT, Leica Aktiengesellschaft, Áustria) que foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo para observação em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM1200EX (JEOL, Brasil) da Plataforma de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal Fluminense, a 80 kV.

2.10 Microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos dos rins foram fixados em glutaraldeído 2,5% por 24 h a 4°C. Os fragmentos foram lavados no tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% diluído em 0,1 M tampão cacodilato de sódio. Após novas lavagens, o material foi desidratado em série crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e absoluto 2x), 30 min cada etapa. O material foi levado ao aparelho de ponto crítico para a substituição do etanol pelo CO₂, posteriormente fixados em *stubs* com fita adesiva de carbono e metalizados com ouro. Após a metalização, o material foi analisado no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM-6390-LV da Plataforma Rudolf Barth de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, a 25 kV.

2.11 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pela comparação entre os grupos, e as diferenças entre eles foram testadas.

A comparação dos dados foi realizada através do teste *t-Student* (no período pré-tratamento) ou *two-way ANOVA* (no período pós-tratamento) seguindo-se do pós-teste de Holm Sidak. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando valores de $p < 0,05$.

O software Graphpad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, Estados Unidos) foi utilizado para realizar as análises estatísticas e para confecção dos gráficos.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização físico-química do óleo de capivara e da nanoemulsão

A análise organoléptica do óleo de capivara mostrou que, à 25°C, ele se apresentava em estado líquido, límpido com cor amarelo citrino, indicando uma grande quantidade de gordura poli-insaturada. A análise físico-química (Tabela 3) demonstrou que ele possui uma acidez em torno de $0,378 \pm 1,68$, o que corrobora com a quantidade de ácido oleico encontrado na análise da composição do óleo de capivara (3,76%) descrito na Tabela 4 e se encontra dentro dos valores de referência estabelecidos pela Instrução Normativa Nº 49, de 22 de dezembro de 2006, do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA).

A avaliação do índice de peróxido mostrou uma baixa rancidez, $5,08 \pm 0,712$ em uma escala de 0 a 20, onde 20 é considerado alto teor de rancidez, estabelecendo-se no limite superior determinado pela IN 49/2006. Este dado é corroborado pela ausência de umidade na amostra, visto que a umidade pode levar a reação de hidrólise e oxidação dos AGs poliinsaturados e aumentar a rancidez do óleo. A avaliação de cinzas totais no óleo mostrou um teor de 6,84% de impurezas. Apesar de poder ser considerado um valor elevado, o método de extração do óleo de capivara doado pelo criadouro não foi qualificado e o óleo não foi refinado, o que pode estar diretamente relacionado ao valor do teor de impurezas na amostra (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos do óleo de capivara. O desvio calculado é o desvio padrão relativo

Parâmetros	Óleo de capivara
Acidez (% ácido oleico)	$0,378 \pm 1,68$
Índice de peróxidos (meq/ Kg)	$5,08 \pm 0,712$
Cinzas (% m/m)	6,84
Umidade	Ausente

Fonte: A autora, 2023.

A análise da composição química do óleo de capivara foi realizada por cromatografia de alta eficiência (Tabela 4) e mostrou a presença de diversos AGs, dentre eles o ácido palmítico (56,06%), o ácido esteárico (16,22%), o ácido linoleico (10,93%), o ácido mirístico (9,48%) e o ácido oleico (3,76%) como os principais componentes do óleo de capivara. Para obtenção de valores referenciais da composição de óleo rico em PUFA's, foi utilizado o óleo de peixe. O óleo de peixe apresentou valores menores para os ácidos palmítico (52,73%), esteárico (11,55%), linoleico (2,63%) e oleico (2,62%) e valor elevado para ácido mirístico (21,48%) em sua composição quando comparado com o óleo de capivara.

Tabela 4 - Composição química do óleo de capivara

COMPOSTO	ÓLEO DE CAPIVARA		ÓLEO DE PEIXE	
	Área	%	Área	%
Ác. Caprico	188340	0,15	11676	0,02
Ác. Laurico	249570	0,2	323897	0,57
Ác. Mirístico	11717628	9,48	12246077	21,48
Ác. Palmitoleico	3799566	3,07	4327190	7,59
Ác. Palmítico	69325636	56,06	30059691	52,73
Ác. Linoleico	13518208	10,93	1491217	2,62
Ác. Oleico	4645935	3,76	1494724	2,62
Ác. Esteárico	20058741	16,22	6584705	11,55
Ác. Araquídico	152567	0,12	278791	0,49
Ác. Erucico	-	-	944	0
Ác. Beenico	5221	0	43290	0,08
Ác. Lignocérico	-	-	149928	0,26
TOTAL	123661412	100	57012130	100

Fonte: A autora, 2023.

Além disso, foram analisadas as características organolépticas do óleo de capivara e as nanoemulsões contendo o óleo de capivara e óleo inerte (Nanoemulsão Branca- NB), utilizada como controle negativo (Tabela 5). As nanoemulsões do óleo de capivara e branca apresentavam-se também em estado líquido, com cor branca leitosa sem deposição de precipitado. Utilizando duas metodologias de avaliação das propriedades físico-químicas das nanoemulsões – análise por difração a laser e a espectroscopia de correlação de fótons– as nanoemulsões NB apresentaram um diâmetro entre $0,186 \pm 0,012 \mu\text{m}$ e $175,0 \pm 0,007 \text{ nm}$, respectivamente. A análise das nanoemulsões contendo óleo de capivara (OCN) evidenciaram uma variação de diâmetro maior entre as partículas ($0,337 \pm 0,041 \mu\text{m}$ e $183,9 \pm 2,37 \text{ nm}$, respectivamente). Utilizando as mesmas metodologias acima, a homogeneidade e amplitude de

distribuição das partículas nas formulações foram avaliadas através de parâmetros como a distribuição dos tamanhos da partícula (Span) e o índice de polidispersão (PDI). Nossas análises evidenciaram uma distribuição de partículas de $1,725 \pm 0,025$ Span e PDI de $0,089 \pm 0,021$ para nanoemulsão NB. Já a nanoemulsão OCN apresentou uma distribuição de tamanho de partículas de $0,651 \pm 0,039$ Span e PDI $0,109 \pm 0,022$. Além disso, foi observado pH ácido (NB: $5,44 \pm 0,27$ e OCN: $5,57$) e os valores negativos, próximos de zero, do potencial Zeta (NB: $-6,72 \pm 0,13$ e OCN: $-9,43 \pm 0,68$).

Tabela 5 – Caracterização físico-química da nanoemulsão branca (NB) e nanoemulsão contendo o óleo de capivara (OCN)

Características		Resultados	
		NB	OCN
Difração à Laser	Difração de esfera equivalente (d4.3) (μm)	$0,186 \pm 0,012$	$0,337 \pm 0,041$
	Distribuição do tamanho das partículas (Span)	$1,725 \pm 0,025$	$0,651 \pm 0,039$
Espectroscopia de correlação de fótons	Diâmetro médio das nanopartículas (Z-Average) (nm)	$1,75 \pm 0,007$	$183,9 \pm 2,37$
	Índice de polidispersão (PI)	$0,089 \pm 0,021$	$0,109 \pm 0,022$
	Potencial Zeta (mV)	$-6,72 \pm 0,13$	$-9,43 \pm 0,68$
	pH	$5,44 \pm 0,27$	$5,57$

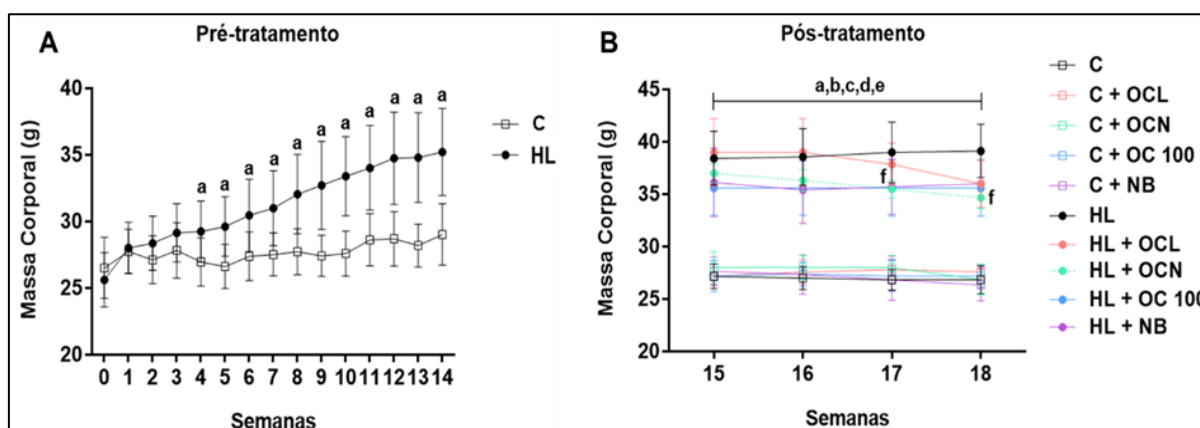
Fonte: A autora, 2023.

3.2 Análise da massa corporal

A MC dos camundongos foi verificada semanalmente durante todo o período experimental a partir da semana zero (antes de iniciar a administração das dietas). No período pré-tratamento, a MC dos animais do grupo C se manteve constante durante todas as semanas ($27,8 \pm 1,5$ g). Os animais do grupo HL apresentaram um aumento progressivo e significativo da MC ($31,2 \pm 2,3$ g) quando comparados com os animais alimentados com dieta controle, a partir da 4ª semana de experimento (Figura 9A).

No período pós-tratamento, a MC dos animais dos grupos alimentados com dieta controle (C: $26,9 \pm 1$ g, C+OCL: $27,5 \pm 0,9$ g, C+OCN: $27,7 \pm 1,3$ g, C+OC100: $27,2 \pm 1,2$ g e C+NB: $27 \pm 1,6$ g) permaneceu constante e não apresentou diferenças significativas entre eles. Já a MC dos animais dos grupos alimentados com dieta HL continuou aumentada quando comparado aos grupos alimentados com dieta controle. Os grupos HL+OC100, HL+NB e HL não apresentaram diferença significativa entre si ao longo das semanas de tratamento ($35,6 \pm 2,4$ g; $35,8 \pm 2,7$ g; $38,7 \pm 2,5$ g, respectivamente). Os grupos HL+OCL e HL+OCN apresentaram uma redução da MC ($37,9 \pm 2,8$ g; $35,8 \pm 1,2$ g, respectivamente), porém somente no grupo HL+OCN foi observada uma diminuição significativa quando comparado ao grupo HL a partir da 17ª semana (Figura 9B).

Figura 9 – Evolução da massa corporal dos grupos experimentais



Legenda: Evolução da massa corporal em gramas (g); dados referentes a MC de camundongos dos grupos C e HL, avaliada nas semanas pré-tratamento (A), dados referentes a MC de camundongos de todos os grupos experimentais, avaliada nas semanas pós-tratamento (B).

Nota: (a), (b), (c), (d), (e), (f) representam $p < 0,05$ em relação aos grupos C, C+OCL, C+OCN, C+OC100, C+NB e HL, respectivamente. $n=6$ para todos os grupos experimentais.

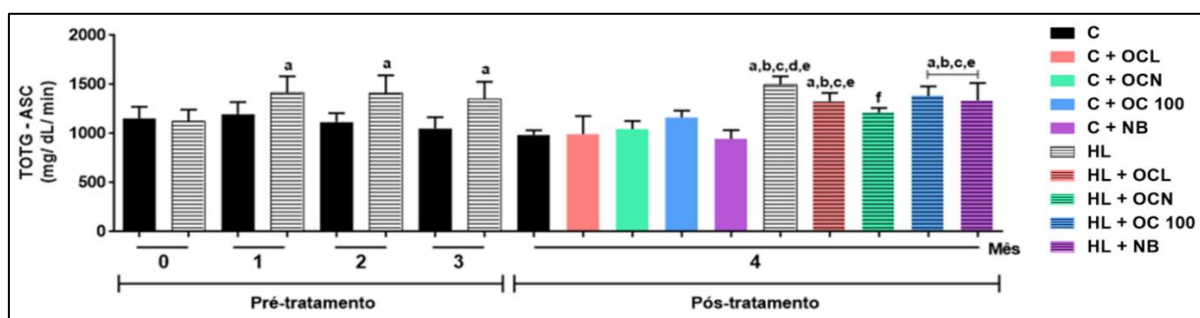
Fonte: A autora, 2023.

3.3 Análise do teste oral de tolerância a glicose

O TOTG foi realizado nos camundongos antes do início do experimento para verificação de uma amostra homogênea (mês 0) e mensalmente nos períodos pré (meses 1, 2 e 3) e pós tratamento (mês 4). Os resultados foram avaliados pela área sob a curva (ASC) (Figura 10).

No período pré-tratamento, foi observado que os animais do grupo HL ($1324 \pm 199,5$ mg/ dL/ min) apresentaram um aumento significativo dos níveis de glicose plasmática a partir do 1º mês de administração das dietas comparado aos animais do grupo C ($1129,5 \pm 122,9$ mg/ dL/ min). No período pós-tratamento, os níveis de glicose dos animais dos grupos alimentados com dieta controle (C: $988,6 \pm 45,6$ mg/ dL/ min, C+OCL: $994,7 \pm 184,4$ mg/ dL/ min, C+OCN: $1045 \pm 83,3$ mg/ dL/ min, C+OC100: $1163,6 \pm 69,5$ mg/ dL/ min e C+NB: $946,2 \pm 89,4$ mg/ dL/ min) permaneceu constante e não apresentou diferenças significativas entre si. No entanto, os grupos HL, HL+OC100 e HL+NB ($1498,3 \pm 86,5$ mg/ dL/ min; $1380,6 \pm 99,5$ mg/ dL/ min; 1339 ± 176 mg/ dL/ min, respectivamente) apresentaram um aumento significativo dos níveis de glicose em relação aos grupos alimentados com a dieta controle. Nos grupos HL+OCL e HL+OCN ($1328,6 \pm 84,8$ mg/ dL/ min e $1212,8 \pm 48,4$ mg/ dL/ min, respectivamente) foi observado uma diminuição dos níveis de glicose plasmática comparado ao grupo HL. No entanto, somente o grupo HL+OCN apresentou diminuição significativa em relação ao grupo HL, indicando que o tratamento com nanoemulsão de óleo de capivara foi capaz de atenuar o quadro de intolerância à glicose.

Figura 10 - Teste oral de tolerância a glicose (mg/ dL/ min) nos períodos pré e pós-tratamento de todos os grupos experimentais



Nota: Teste oral de tolerância a glicose (mg/ dL/ min) nos períodos pré e pós-tratamento de todos os grupos experimentais. Os resultados foram avaliados pela área sob a curva (ASC). (a), (b), (c), (d), (e), (f) representam $p < 0,05$ em relação aos grupos C, C+OCL, C+OCN, C+OC100, C+NB e HL, respectivamente. $n=6$ para todos os grupos experimentais.

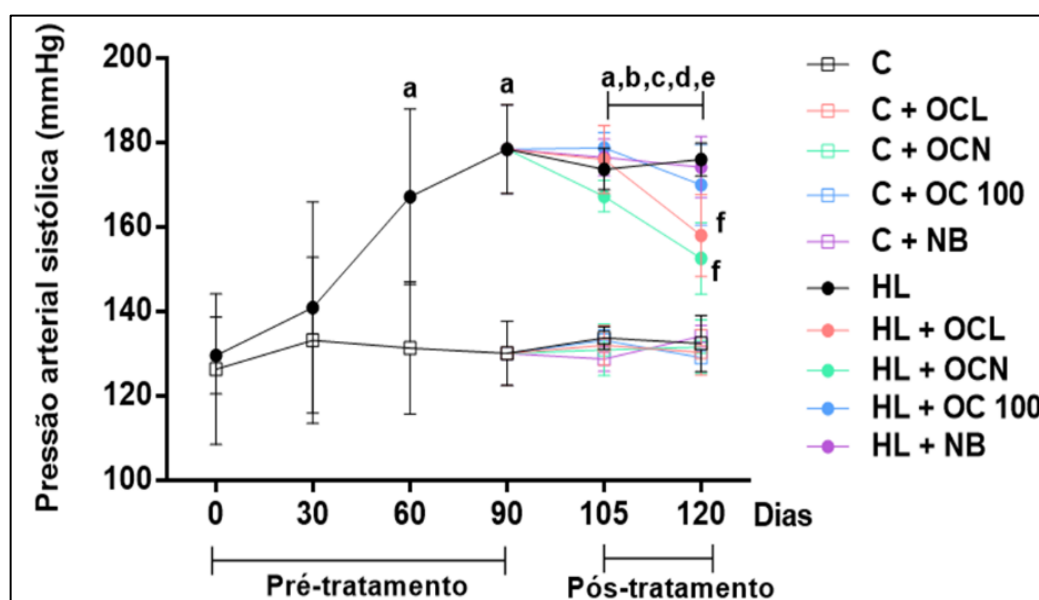
Fonte: A autora, 2023.

3.4 Análise da pressão arterial sistólica

A PAS dos camundongos foi verificada mensalmente durante todo o período pré-tratamento a partir da semana zero. No período pós-tratamento, a PAS foi aferida

quinzenalmente, a fim de acompanhar o efeito do tratamento na evolução da hipertensão (Figura 11). No período pré-tratamento, a PAS dos animais do grupo HL apresentou aumento progressivo e significativo a partir do 2º mês de experimentação ($172,8 \pm 17,2$ mmHg) comparado aos animais do grupo C, que se manteve constante ao longo das semanas ($130,2 \pm 10,9$ mmHg). No período pós-tratamento, a PAS dos animais dos grupos alimentados com dieta controle se manteve constante durante todas as semanas do experimento (C: $133 \pm 4,85$ mmHg; C+OCL: $130,9 \pm 4,87$ mmHg; C+OCN: $131,3 \pm 5,96$ mmHg; C+OC100: $130,8 \pm 2,86$ mmHg; C+NB: $131,4 \pm 3,82$ mmHg) e não apresentaram diferenças significativas entre si. Já a PAS dos animais dos grupos alimentados com dieta HL apresentou um aumento significativo comparada à dos animais alimentados com dieta controle. No entanto, os animais dos grupos tratados HL+OCL e HL+OCN apresentaram redução significativa ($167 \pm 12,6$; $159,9 \pm 9,9$ mmHg, respectivamente) dos níveis de PAS na última semana de tratamento quando comparado aos grupos HL, HL+ OC100 e HL + NB ($174,8 \pm 4,3$ mmHg; $174,4 \pm 8,2$ mmHg; $175,3 \pm 5,8$ mmHg, respectivamente).

Figura 11 – Evolução da pressão arterial sistólica de todos os grupos experimentais nos períodos pré e pós-tratamento



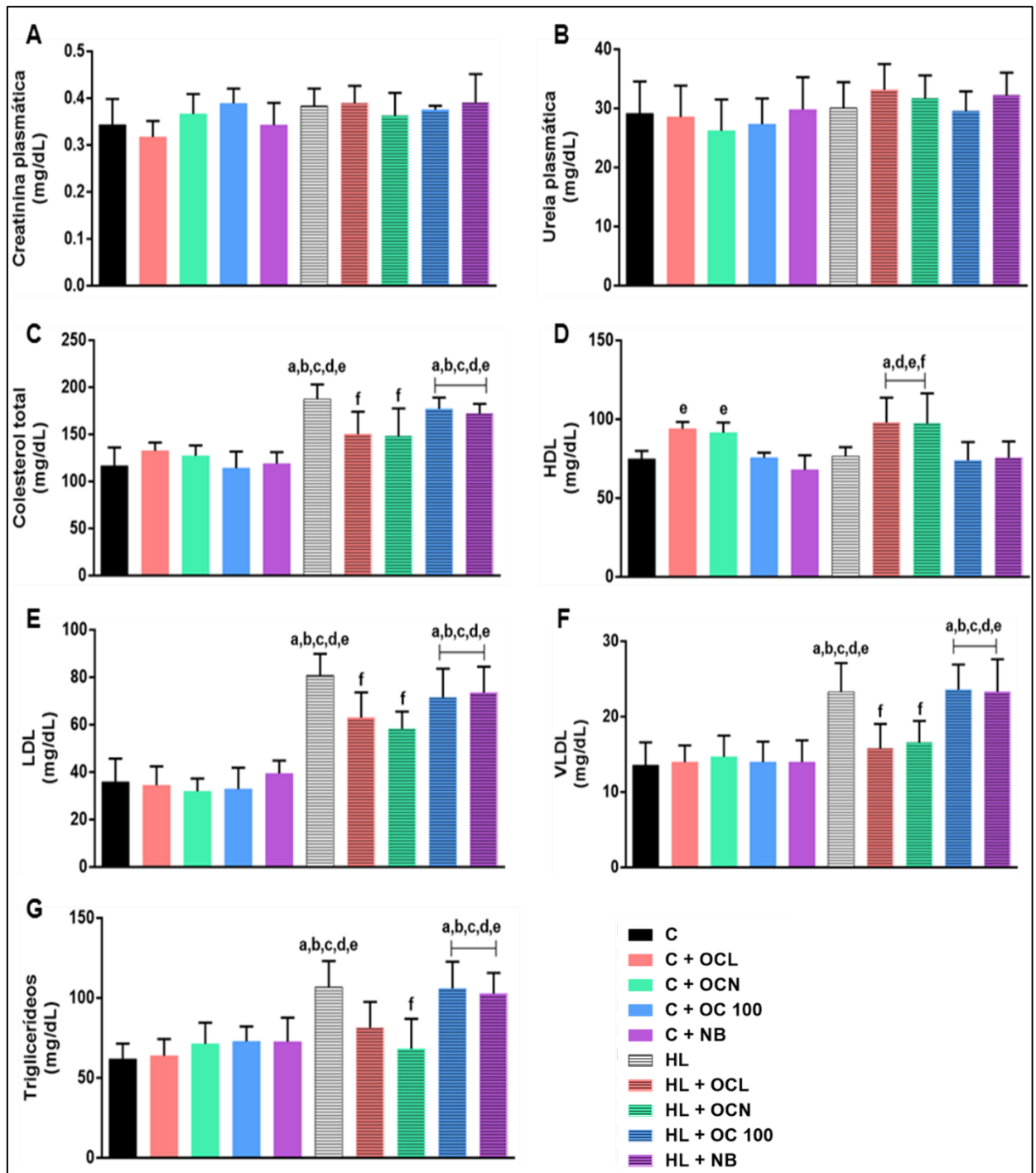
Nota: Evolução da pressão arterial sistólica em milímetros de mercúrio (mmHg) de todos os grupos experimentais nos períodos pré e pós-tratamento. (a), (b), (c), (d), (e), (f) representam $p < 0,05$ em relação aos grupos C, C+OCL, C+OCN, C+OC100, C+NB e HL, respectivamente. $n=6$ para todos os grupos experimentais.

Fonte: A autora, 2023.

3.5 Análise bioquímica plasmática

Os níveis plasmáticos de creatinina, ureia, CT, HDL, LDL, VLDL e TG foram avaliados nos animais de todos os grupos experimentais (Figura 12). Os níveis de creatinina (Figura 12 A) e ureia (Figura 12 B) não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Os grupos HL, HL+OC100 e HL+NB apresentaram aumento significativo dos níveis de CT (Figura 12 C), LDL (Figura 12 E), VLDL (Figura 12 F) e TG (Figura 12 G) quando comparado aos grupos alimentados com dieta controle (C, C+OCL, C+OCN, C+OC100 e C+NB). Já nos grupos tratados HL+OCL e HL+OCN foi observada uma diminuição significativa dos níveis de CT, LDL e VLDL comparado ao grupo HL. Na análise de TG, somente o grupo HL+OCN apresentou diminuição significativa comparado ao grupo HL. Em relação ao HDL, considerado o colesterol bom, ambos os grupos tratados HL+OCL e HL+OCN apresentaram um aumento significativo em relação aos grupos C, C+OC100, C+NB e HL.

Figura 12 – Parâmetros bioquímicos no plasma de todos os grupos experimentais



Legenda: níveis de creatinina (mg/dL) (A); níveis de ureia (mg/dL) (B); níveis de colesterol total (mg/dL); D: níveis de HDL (mg/dL) (C); níveis de LDL (mg/dL) (E); níveis de VLDL (mg/dL) (F); níveis de triglicerídeos (mg/dL) (G).

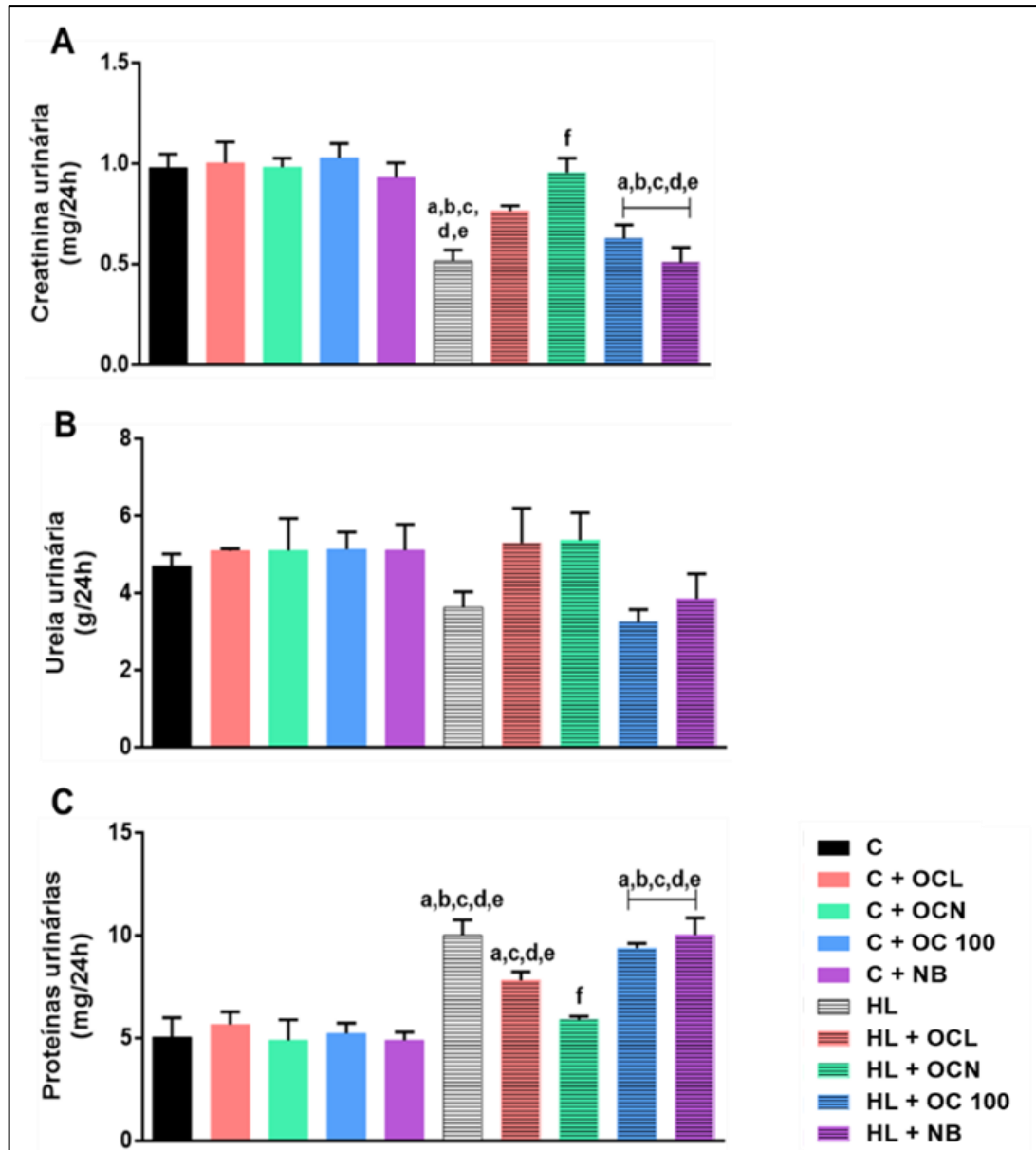
Nota: (a), (b), (c), (d), (e), (f) representam $p < 0,05$ em relação aos grupos C, C+OCL, C+OCN, C+OC100, C+NB, e HL, respectivamente. $n=6$ para todos os grupos experimentais.

Fonte: A autora, 2023;

3.6 Análise bioquímica urinária

Os níveis de creatinina, ureia e proteínas urinárias foram avaliados a partir da urina dos camundongos de todos os grupos experimentais (Figura 13). Nos níveis de creatinina (Figura 13 A), os animais dos grupos HL, HL+OC100 e HL+NB evidenciaram uma diminuição significativa de sua excreção quando comparado aos animais dos grupos alimentados com dieta controle, que não apresentaram diferença entre si. Os animais dos grupos HL+OCL e HL+OCN apresentaram um aumento da excreção de creatinina comparados ao grupo HL, porém somente o grupo HL+OCN apresentou um aumento significativo. Os níveis de ureia (Figura 13 B) não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais, apesar dos grupos HL, HL+OC100 e HL+NB indicarem uma diminuição da excreção de ureia comparado aos animais dos grupos alimentados com dieta controle. Na análise de proteínas urinárias (Figura 13 C), os grupos alimentados com dieta controle não apresentaram diferença significativa entre si. Os grupos HL, HL+OC100 e HL+NB apresentaram aumento significativo da excreção de proteínas quando comparado aos grupos alimentados com dieta controle. Os grupos HL+OCL e HL+OCN apresentaram uma redução da excreção de proteínas em relação ao grupo HL, porém somente o grupo HL+OCN diminuiu significativamente a excreção quando comparado ao grupo HL.

Figura 13 – Parâmetros bioquímicos na urina de todos os grupos experimentais



Legenda: níveis de creatinina (mg/24h) (A); níveis de ureia (g/24h) (B); níveis de proteínas urinárias (mg/24h) (C).

Nota: (a), (b), (c), (d), (e), (f) representam $p < 0,05$ em relação aos grupos C, C+OCL, C+OCN, C+OC100, C+NB e HL, respectivamente. $n=6$ para todos os grupos experimentais.

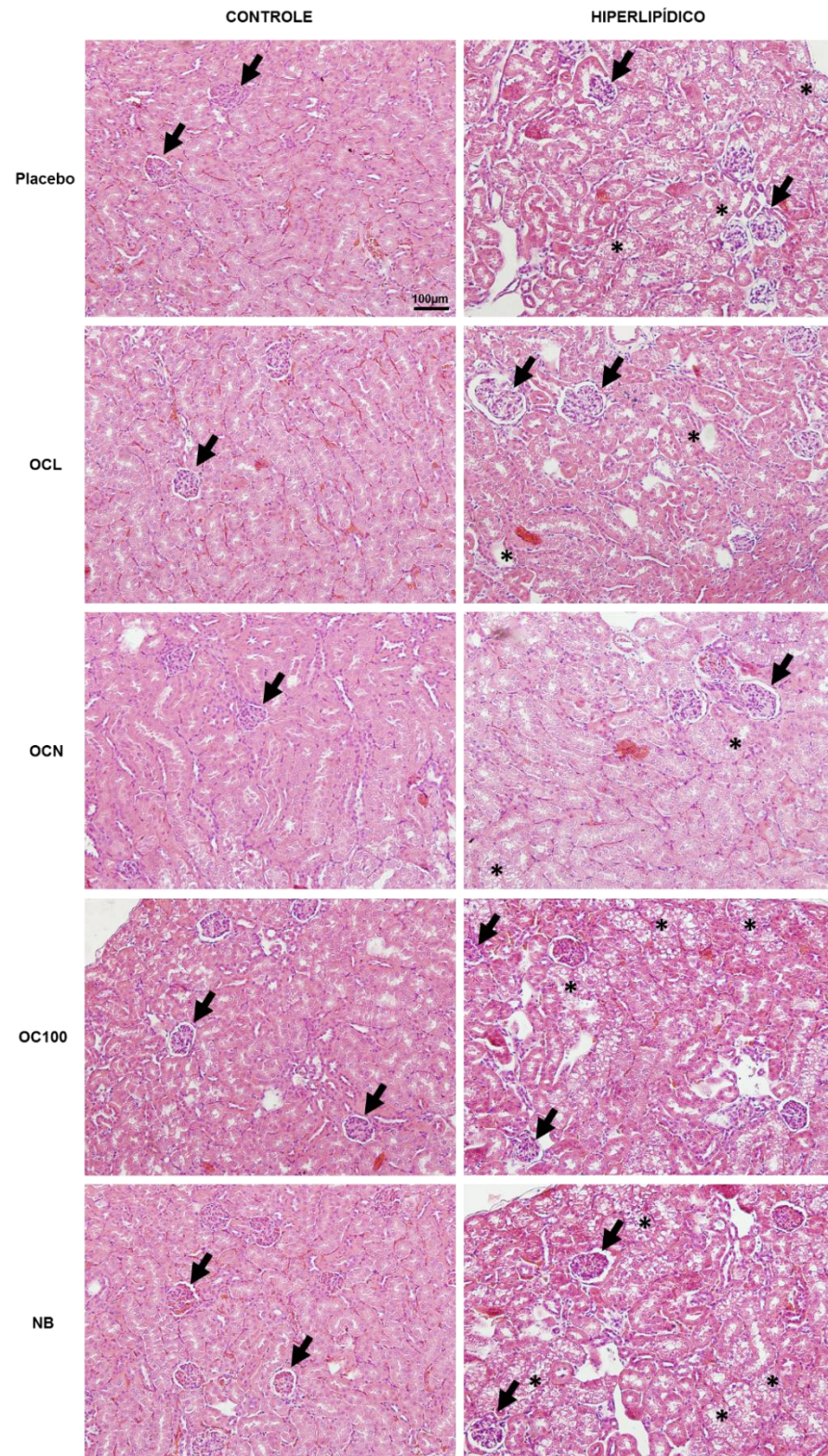
Fonte: A autora, 2023.

3.7 Análise histopatológica do córtex renal

A histopatologia foi analisada através da coloração de Hematoxilina-Eosina (Figura 14). Os grupos alimentados com dieta controle (C, C+OCL, C+OCN, C+OC100 e C+NB) apresentaram os corpúsculos renais (setas) e túbulos contorcidos proximais e distais preservados. No entanto, os grupos HL, HL+OC100 e HL+NB apresentaram perda na estrutura dos corpúsculos e túbulos renais, além de possíveis áreas com vesículas lipídicas (asteriscos). Nos grupos HL+OCL e HL+OCN foi observado diminuição das áreas com vesículas lipídicas e um remodelamento benéfico do córtex renal quando comparado ao grupo HL, principalmente dos corpúsculos e túbulos contorcidos proximais e distais.

Para avaliação das membranas basais presentes nas estruturas do córtex renal de todos os grupos experimentais, foi utilizada a coloração pela técnica do Ácido Periódico Schiff (Figura 15). Os grupos HL, HL+OC100 e HL+NB apresentaram membrana basal intensamente corada, principalmente envolvendo o folheto parietal da cápsula de Bowman (setas) e nos capilares glomerulares, comparado aos demais grupos experimentais. Essa coloração mais intensa indica um aumento da matriz extracelular mesangial nos glomérulos, que pode estar associada a patologias renais. Entretanto, os grupos HL+OCL e HL+OCN evidenciaram preservação da membrana basal da cápsula, dos glomérulos e dos túbulos contorcidos proximais e distais, apresentando coloração comparativa aos grupos alimentados com dieta controle.

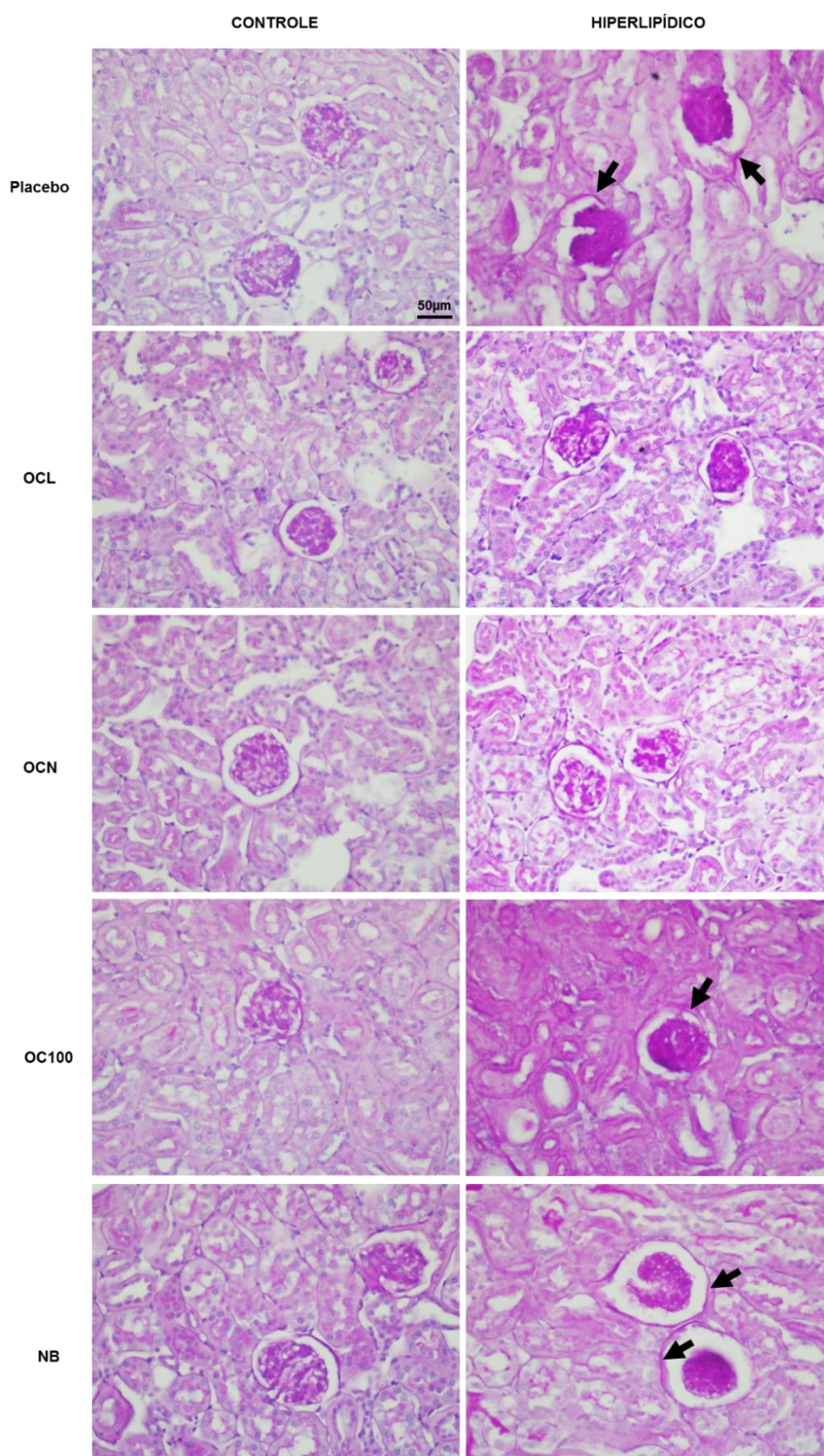
Figura 14 – Avaliação da morfologia do córtex renal em fotomicrografias de todos os grupos experimentais



Nota: As setas indicam os glomérulos e os asteriscos indicam áreas com inclusão lipídica. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de calibração: 100 µm.

Fonte: A autora, 2023.

Figura 15 – Avaliação das membranas basais das estruturas do córtex renal em fotomicrografias dos grupos experimentais



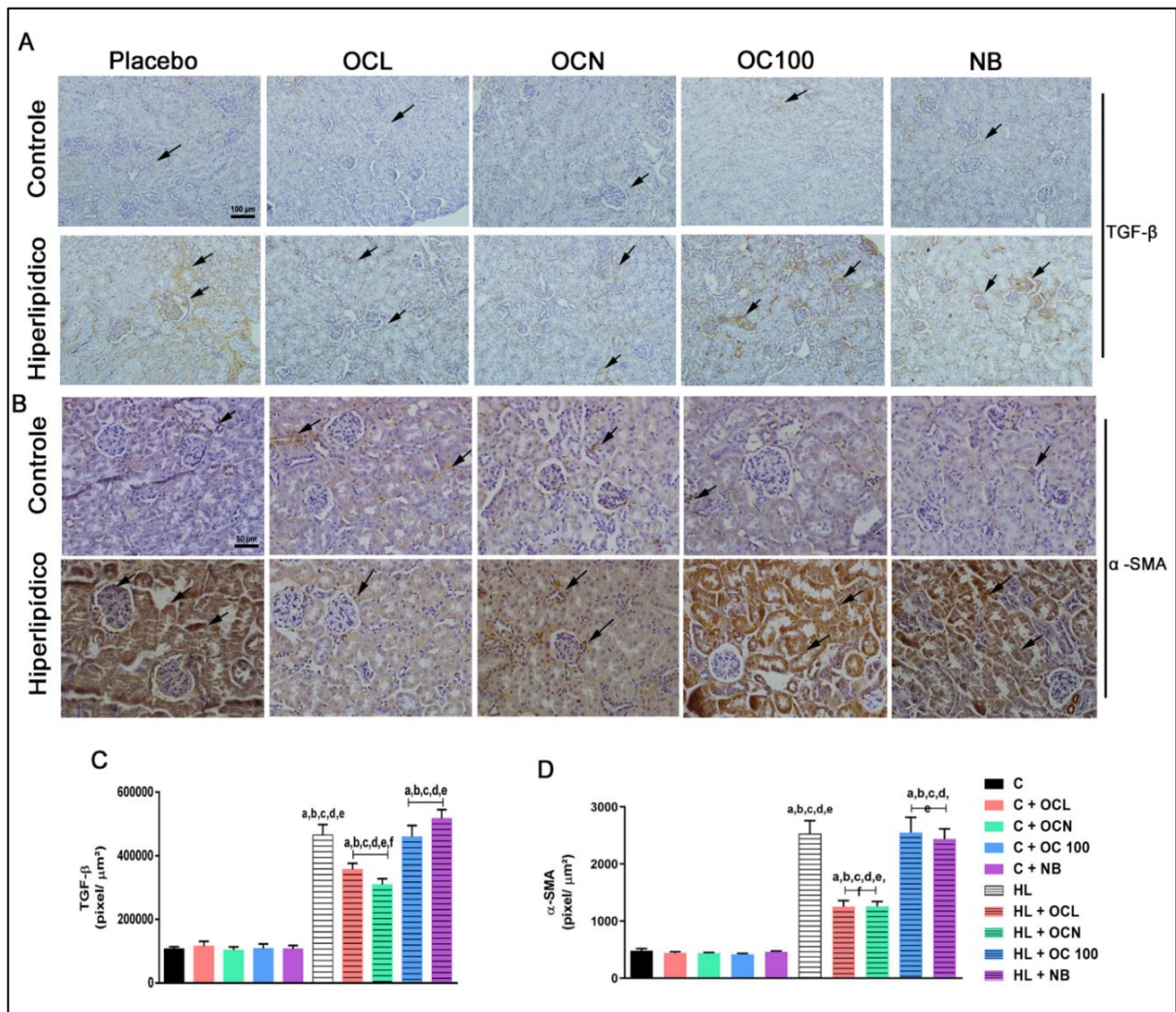
Nota: As setas evidenciam a membrana basal em cor magenta. Coloração: Ácido Periódico-Schiff. Barra de calibração 50 µm.

Fonte: A autora, 2023.

3.8 Análise da fibrose renal

A análise da fibrose renal foi analisada através de estudo imuno-histopatológico, por imunocoloração positiva do anticorpo anti-TGF- β e anti- α -SMA no córtex renal em todos os grupos experimentais (setas) (Figura 16 A e 16 B, respectivamente). Os grupos alimentados com dieta HL (HL, HL+OCL, HL+OCN, HL+OC100 e HL+NB) apresentaram marcação mais evidenciada principalmente nos túbulos, quando comparado aos grupos alimentados com dieta controle (C, C+OCL, C+OCN, C+OC100 e C+NB). Em contrapartida, foi observada uma diminuição das áreas de marcação nos grupos HL+OCL e HL+OCN quando comparado aos grupos HL, HL+OC100 e HL+NB. Através da quantificação dos anticorpos anti-TGF- β e anti- α -SMA, observou-se um aumento significativo no número de células marcadas nos grupos HL, HL+OC100 e HL+NB em relação aos grupos controles, assim como uma diminuição significativa desses marcadores nos grupos HL+OCL e HL+OCN quando comparado ao grupo HL, como mostra as Figuras 16 C e 16 D, respectivamente.

Figura 16 – Imunomarcção e quantificação no córtex renal com os anticorpos anti-TGF- β e anti- α -SM



Legenda: Fotomicrografias da imunomarcção específica para TGF- β (A). Fotomicrografias da imunomarcção específica para α -SMA (B). Quantificação (pixel/ μm^2) da imunomarcção com o anticorpo anti-TGF- β (C). Quantificação (pixel/ μm^2) da imunomarcção com o anticorpo anti- α -SMA (D).

Nota: As setas indicam a imunomarcção positiva principalmente nos túbulos. (a), (b), (c), (d), (e), (f) representam $p < 0,05$ em relação aos grupos C, C+OCL, C+OCN, C+OC100, C+NB e HL, respectivamente. $n=6$ para todos os grupos experimentais. Barra de calibração: 50 μm (α -SMA) e 100 μm (TGF- β).

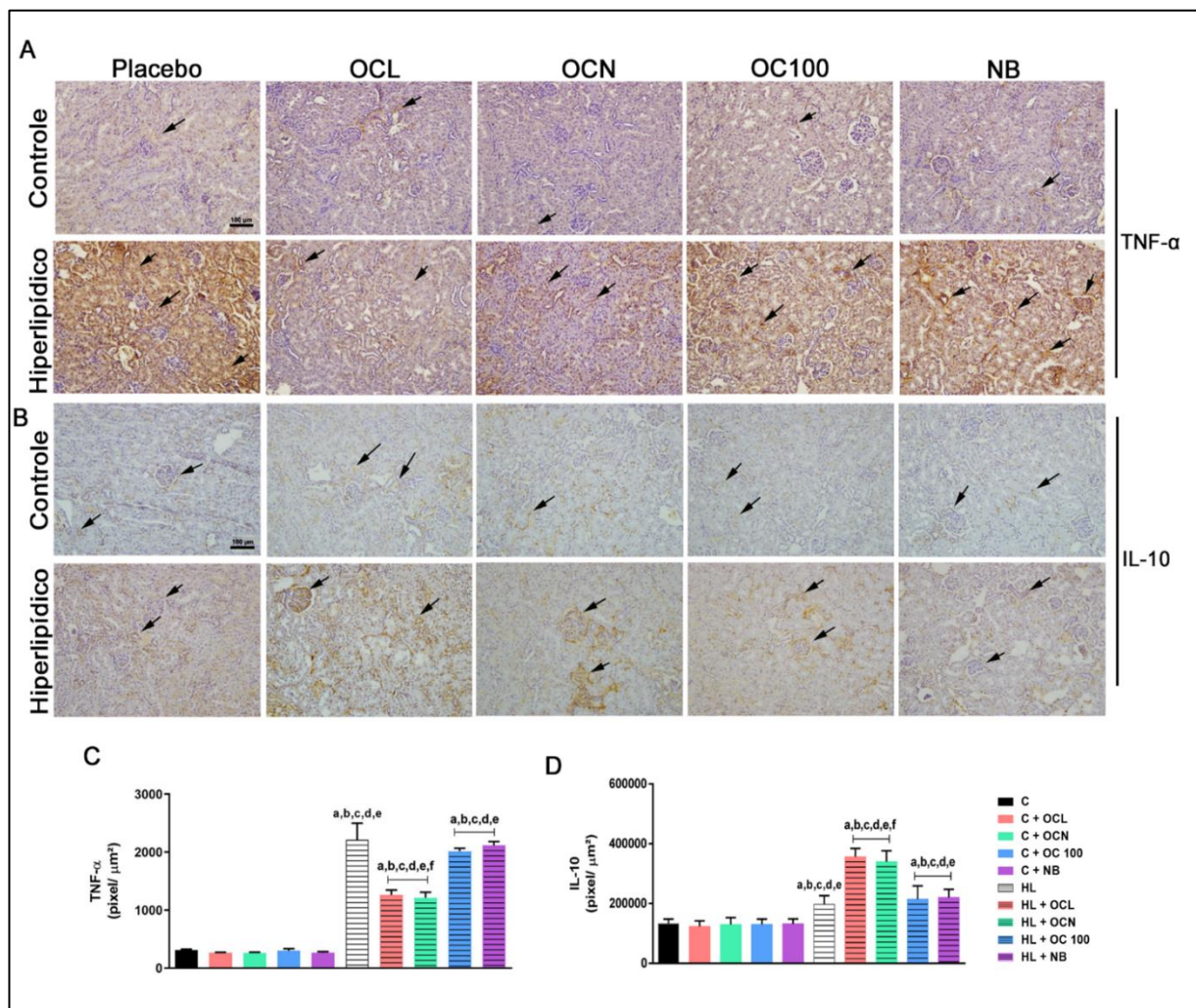
Fonte: A autora, 2023.

3.9 Avaliação na expressão de citocinas inflamatórias por imunohistoquímica

Na imunomarcção específica para TNF- α e IL-10 (Figura 17 A e 17 B, respectivamente), os grupos alimentados com dieta controle evidenciaram uma pequena expressão dessas citocinas. Em contrapartida, os grupos HL, HL+OC100 e HL+NB

apresentaram muitas áreas de intensa marcação de TNF- α (setas) nos túbulos proximais e distais e glomérulos e poucas áreas de marcação de IL-10. Entretanto, os grupos HL+OCL e HL+OCN apresentaram marcações menos frequente de TNF- α e grande expressão de IL-10 quando comparado ao grupo HL. A quantificação de TNF- α e IL-10 estão representadas nas Figuras 17 C e 17 D, respectivamente, e corroboram os achados descritos acima, constando aumento significativo dos níveis de TNF- α nos grupos HL, HL+OC100 e HL+NB e de IL-10 nos grupos HL+OCL e HL+OCN comparados aos demais grupos. Os grupos alimentados com dieta controle não apresentaram diferença significativa entre eles.

Figura 17 – Imunomarcção e quantificação no córtex renal com os anticorpos anti-TNF- α e anti-IL-10



Legenda: Fotomicrografias da imunomarcção específica para anti-TNF- α e IL-10 (A). Quantificação da imunomarcção (pixel/ μm^2) para o anticorpo anti- IL-10 (B). Quantificação da imunomarcção (pixel/ μm^2) para o anticorpo anti-TNF- α (C). Quantificação da imunomarcção (pixel/ μm^2) para o anticorpo anti-IL-10 (D).

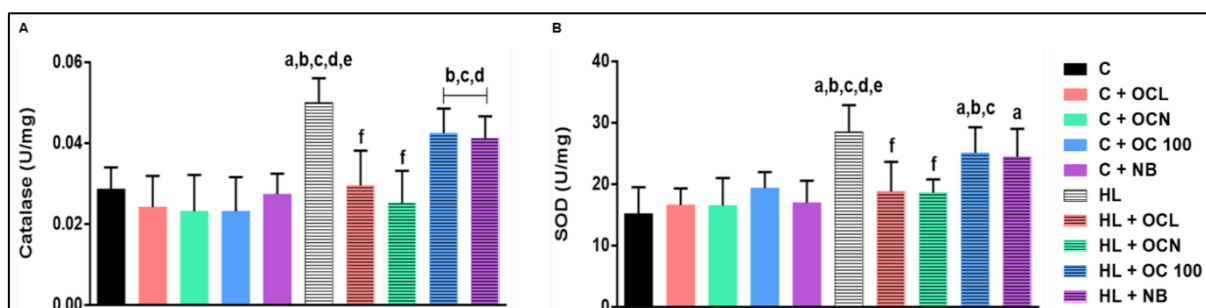
Nota: (a), (b), (c), (d), (e), (f) representam $p < 0,05$ em relação aos grupos C, C+OCL, C+OCN, C+OC100, C+NB e HL, respectivamente. $n=6$ para todos os grupos experimentais. Barra de calibração: 100 μm .

Fonte: A autora, 2023.

3.10 Análise da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo

Na análise da atividade enzimática de marcadores centrais associados ao estresse oxidativo (Figura 18), os grupos alimentados com dieta controle (C, C+OCL, C+OCN, C+OC100 e C+NB) não apresentaram diferença significativa entre eles. O grupo HL apresentou aumento significativo da atividade de CAT (Figura 18 A) e SOD (Figura 18 B) comparado aos grupos alimentados com dieta controle. Em relação aos grupos HL+OC100 e HL+NB, há um aumento significativo da atividade de CAT comparado aos grupos C+OCL, C+OCN e C+OC100. Já na atividade de SOD, há um aumento significativo no grupo HL+OC100 comparado aos grupos C, C+OCL e C+OCN e no grupo HL+NB quando comparado ao grupo C. Nos grupos tratados com o óleo de capivara (HL+OCL e HL+OCN) observa-se uma diminuição tanto da atividade da enzima SOD quanto da CAT comparado ao grupo HL.

Figura 18 – Avaliação da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo de todos os grupos experimentais



Legenda: Avaliação da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (U/mg). Quantificação da atividade da enzima antioxidante Catalase (A); Quantificação da atividade da enzima antioxidante SOD (B).

Nota: (a), (b), (c), (d), (e), (f) representam $p < 0,05$ em relação aos grupos C, C+OCL, C+OCN, C+OC100, C+NB e HL, respectivamente. $n=6$ para todos os grupos experimentais.

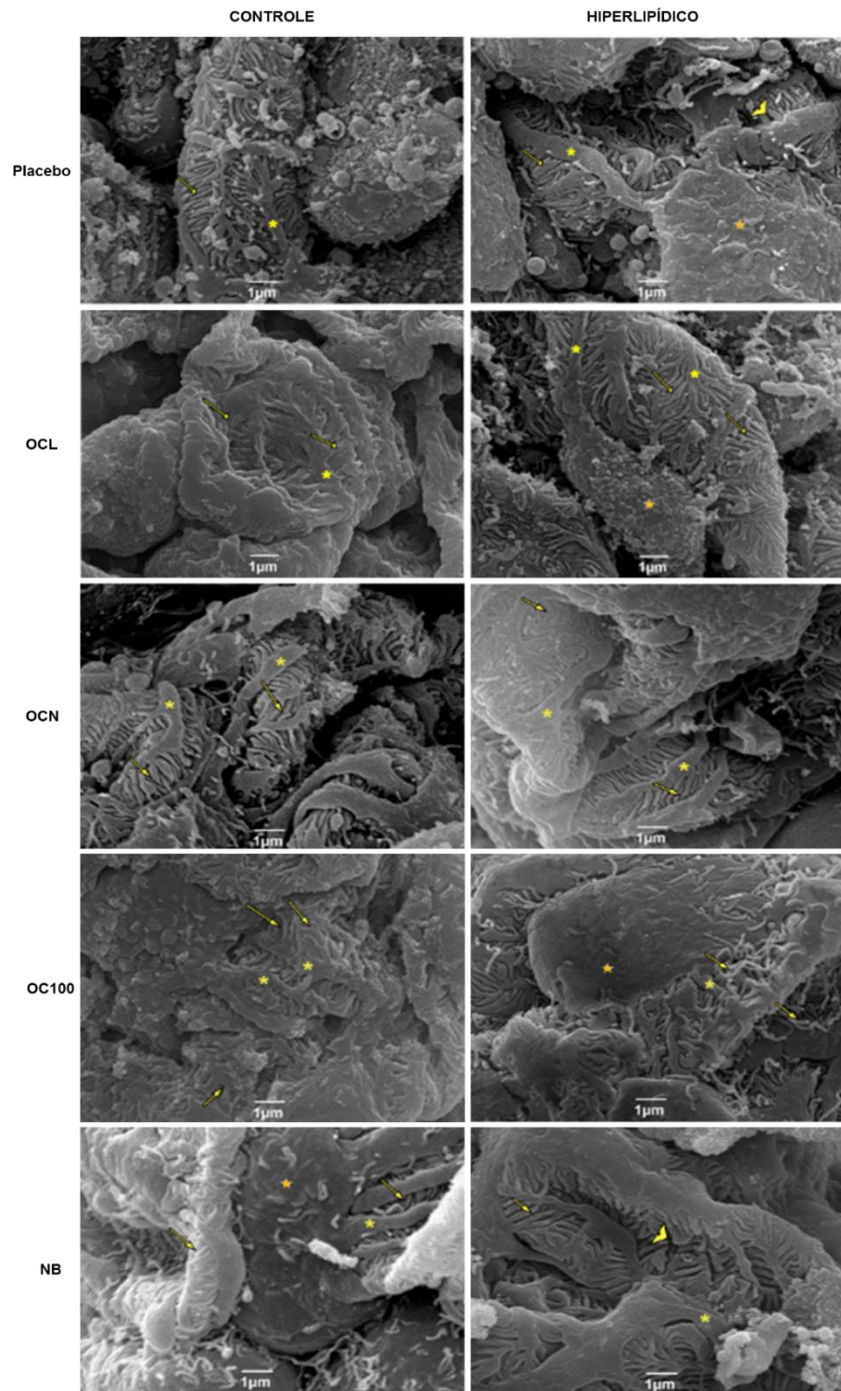
Fonte: A autora, 2023.

3.11 Avaliação da ultraestrutura renal

3.11.1 Microscopia eletrônica de varredura

Na análise da ultraestrutura renal por microscopia eletrônica de varredura (Figura 19), os grupos controles apresentaram podócitos (asterisco) íntegros constituídos de prolongamentos primários e secundários (pedicelos) (seta). Além disso, o corpo celular (estrela) e as fendas de filtração se mostraram preservadas entre as interdigitações regulares dos pedicelos. No entanto, os grupos HF, HF+OC100 e HF+NB apresentaram fenda de filtração mais dilatada (cabeça de seta) e pedicelos (seta) com contornos irregulares, além de muitos não apresentarem interdigitações regulares, assim como espessamento dos prolongamentos primários (asterisco). Além das alterações descritas anteriormente, no grupo HF+NB foi observado pedicelos com terminações dilatadas (seta), além de encurtamento dos mesmos. Já o grupo HF+OC100 apresentou pedicelos mais delgados (seta) com trajeto irregular, impossibilitando a formação das interdigitações, além de prolongamentos primários mais curtos (asterisco). Os grupos HF tratados com óleo livre (HF+OCL) ou nanoemulsão (HF+OCN) apresentaram remodelamento benéfico dos prolongamentos primários (asterisco) e secundários (seta), com interdigitações regulares dos pedicelos. Adicionalmente, os prolongamentos primários se apresentaram mais delgados e alongados em comparação aos grupos HF, HF+OC100 e HF+NB.

Figura 19 – Análise da ultraestrutura renal por microscopia eletrônica de varredura de todos os grupos experimentais



Legenda: Estão indicadas os podócitos (*), os pedicelos (setas), corpo celular (estrela) e dilatação da fenda de filtração glomerular (cabeça de seta).

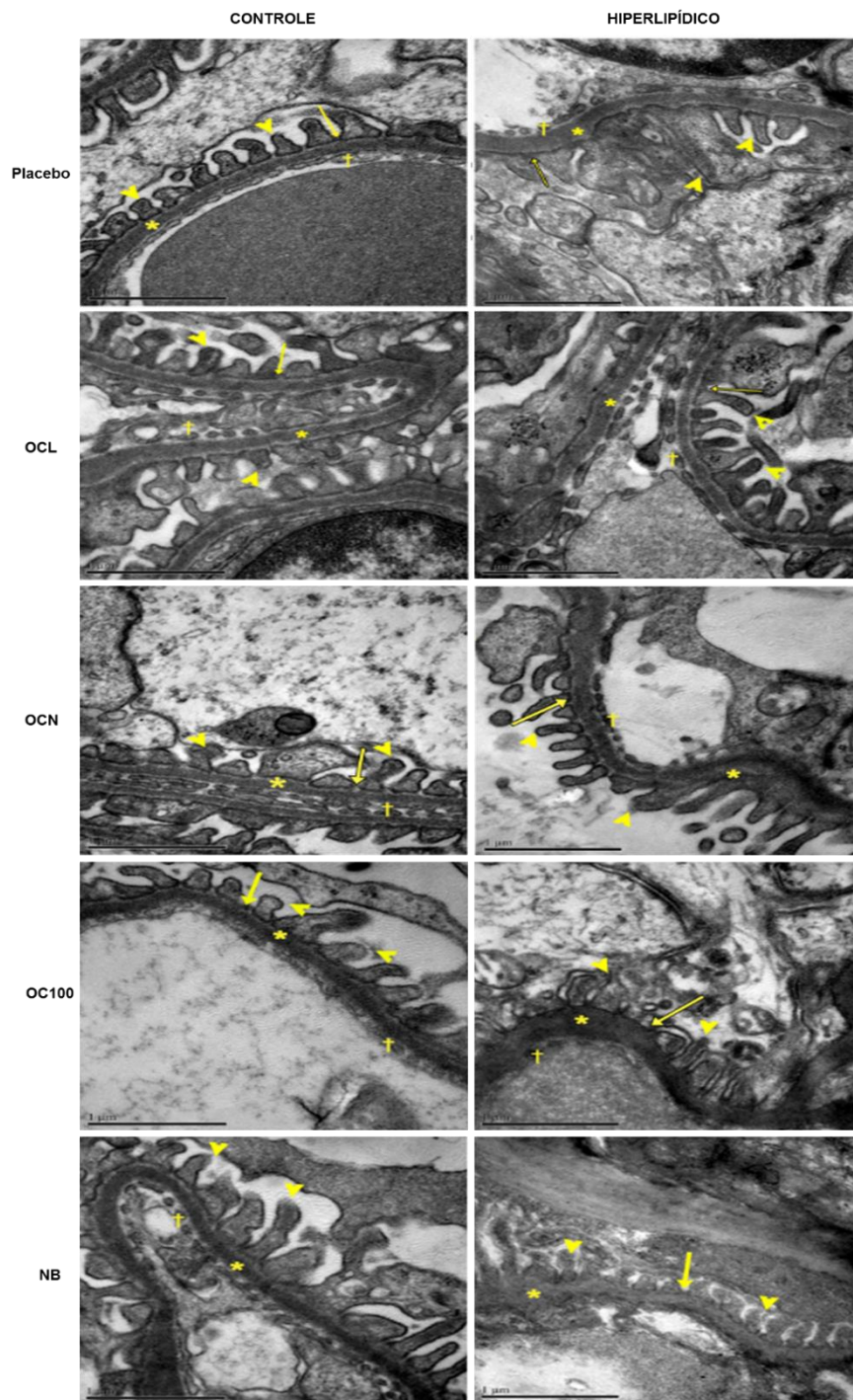
Nota: Barra de calibração: 1 µm.

Fonte: A autora, 2023.

3.11.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Na análise da ultraestrutura renal por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 20), os animais dos grupos controles (C, C+OCL, C+OCN, C+OC100 e C+NB) apresentaram numerosos pedicelos (cabeça de seta) com espessuras regulares formando as fendas de filtração (seta) com membranas evidentes. Além disso, foi observado que a MBG (asterisco) e os poros dos capilares glomerulares (cruz) apresentaram-se íntegros. No entanto, os grupos HF, HF+OC100 e HF+NB apresentaram alterações na ultraestrutura, como espessamento da MBG (asterisco), tamanhos variáveis e irregulares dos pedicelos (cabeça de seta), onde se observam pedicelos com espessuras diferentes. Adicionalmente, há descontinuidade dos poros dos capilares glomerulares fenestrados (cruz). Além das alterações evidenciadas anteriormente, no grupo HF+OC100 não foi possível observar a membrana do poro glomerular, assim como ausência da membrana da fenda de filtração glomerular. Já no grupo HF+NB há ausência dos poros do capilar glomerular fenestrado e pedicelos mais curtos. Os grupos HF tratados com óleo livre ou nanoemulsão (HF+OCL e HF+OCN, respectivamente) apresentaram remodelamento benéfico da morfologia dos pedicelos (cabeça de seta) com fendas de filtração (seta) e membranas preservadas. Além disso, foi observada integridade da MBG (asterisco), assim como continuidade dos poros dos capilares glomerulares (cruz) quando comparado aos grupos HF, HF+OC100 e HF+NB.

Figura 20 – Análise da ultraestrutura renal por microscopia eletrônica de transmissão de todos os grupos experimentais



Legenda: Estão indicadas a fenda de filtração (setas), os pedicelos (cabeças de seta), a MBG (*) e os poros do capilar glomerular fenestrado (†).

Nota: Barra de calibração: 1 μ m.

Fonte : A autora, 2023.

4 DISCUSSÃO

A dieta HL prolongada em camundongos C57Bl/6 é um modelo estabelecido de dieta que induz obesidade (BELLANTI, *et al.*, 2017). A alimentação com alto teor de lipídeos (60% da energia total) em animais experimentais é conhecida por induzir diversas alterações sistêmicas, como obesidade, hiperglicemia, perfil lipídico anormal, alterações renais, incluindo albuminúria e lesões glomerulares (DEJI *et al.*, 2008), além de aumento da PAS (CHAAR *et al.*; 2016). As modificações funcionais são intensificadas pelo grau e tempo de instalação da obesidade e pelo ambiente pró-inflamatório e pró-fibrótico típico da obesidade. O resultado final são alterações morfo-estruturais glomerulares, que podem se manifestar sob a forma de glomerulopatia associada à obesidade (KAMBHAM *et al.*, 2001).

No presente estudo, observamos que a indução de obesidade em camundongos C57BL/6 causou aumento da MC e elevação da PAS. De acordo com estudos anteriores, a fisiopatologia da hipertensão associada à obesidade depende de múltiplos fatores incluindo dieta, metabolismo, disfunção endotelial e vascular, desequilíbrio neuroendócrino, retenção de sódio, hiperfiltração glomerular, proteinúria e resposta imune e inflamatória desajustada (RE, 2009; DEMARCO *et al.*, 2014). Os animais obesos tratados tanto com óleo de capivara livre (5000 mg/ Kg) quanto em nanoemulsão apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de PAS, porém, somente o grupo obeso tratado com nanoemulsão de óleo de capivara foi capaz de reduzir significativamente os níveis de MC.

Além disso, os animais do grupo HL apresentaram intolerância à insulina, evidenciada através do aumento dos níveis de glicose plasmática. As gorduras saturada e monoinsaturada são capazes de promover obesidade e resistência à insulina, sendo estas capazes de gerar aumento da lipogênese. Além disso, a banha de porco (mistura de gordura saturada e monoinsaturada), utilizada neste trabalho, é a mais recomendada para a geração de um modelo válido de roedor obeso com alterações metabólicas (BUETTNER *et al.*, 2006). Em nosso trabalho, somente os animais tratados com nanoemulsão de óleo de capivara apresentaram diminuição significativa dos níveis de glicose plasmática, evidenciando uma melhora da resistência à insulina causada pela obesidade.

Cada vez mais são apontadas evidências de que as lesões celulares de lipotoxicidade podem causar lesão renal, incluindo inflamação, estresse oxidativo, fibrose, alterações nas vias de sinalização intracelulares e apoptose induzida por lipídios (KATSOULIERIS *et al.*, 2010).

Nossos achados revelam que camundongos obesos apresentaram alteração dos parâmetros lipídicos, alteração da morfologia estrutural e ultraestrutural com perda da função renal, além de estresse oxidativo e aumento da fibrose e inflamação renal.

Nossos achados mostraram que tanto o tratamento com óleo de capivara livre (5000 mg/kg) quanto em nanoemulsão reduziram a fibrose renal, diminuindo a expressão de TGF- β e α -SMA, desempenhando um papel protetor renal através da supressão da produção de colágeno. Estudos anteriores indicaram que o TGF- β atua como um dos mediadores chave na progressão da fibrose renal patológica através da produção de matriz extracelular, aumentando a expressão do gene do colágeno tipo IV nas células do epitélio tubular, causando hipertrofia e fibrose renal (BOTTINGER, 2007; FELDMAN *et al.*, 2008; KELLY *et al.*, 2007; NUSSBERGER *et al.*, 2007). Um dos efeitos fibróticos do TGF- β ocorre por indução de apoptose e está associada à depleção de podócitos, glomeruloesclerose, perda de capilares glomerulares ou peritubulares e atrofia tubular (MEIER *et al.*, 2007; CHO, 2010).

O α -SMA é considerado um marcador de fibroblastos maduros ou miofibroblastos. A produção de miofibroblastos no rim constitui a etapa crítica que leva à fibrose intersticial renal (NAGAMOTO *et al.*, 2000), onde a formação dos mesmos é mediada pela transição epitelial-mesenquimal (EMT) das células epiteliais tubulares em fibroblastos e miofibroblastos. Sendo assim, a EMT renal é considerada outra via importante na patogênese e progressão da fibrose intersticial renal (BARNES *et al.*, 2011), onde ocorre perda de moléculas de adesão de células epiteliais, como a e-caderina epitelial, que são transformadas em marcador mesenquimal α -SMA (LIU, 2010; KRIZ *et al.*, 2011). Estudos anteriores indicaram que a inibição do acúmulo de miofibroblastos pela via EMT é fundamental na prevenção da fibrose tubulointersticial e na preservação da função renal (BARNES *et al.*, 2011; KRIZ *et al.*, 2011; LIU, 2010). Estudos evidenciaram que a utilização de AGs n-3 reduziu a atrofia tubular focal e fibrose intersticial, com supressão da expressão renal de α -SMA (FUJIKAWA *et al.*, 1994; SABRY *et al.*, 2006).

A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, porém a produção excessiva pode conduzir a lesões oxidativas (BARBOSA *et al.*, 2010). No presente estudo observamos um aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD nos animais obesos, indicando um aumento de espécies reativas de oxigênio e, consequentemente, do estresse oxidativo. Os sistemas antioxidantes existem sob a forma de compostos enzimáticos e não enzimáticos. O sistema anti-oxidante enzimático inclui a SOD e CAT, por exemplo. Estas enzimas são responsáveis pela remoção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente (PIETTA, 2000; YU, 1994). O desequilíbrio entre os sistemas

antioxidante e pró-oxidante resulta no estresse oxidativo, que promove alterações como peroxidação lipídica, fragmentação de DNA e oxidação de diferentes moléculas, levando à morte celular (BARBOSA *et al.*, 2010). Em indivíduos obesos e na presença de produção excessiva de espécies reativas de oxigênio ou resposta inflamatória, o rim terá uma grande chance de ser exposto ao estresse celular, podendo sofrer alterações estruturais e perda da sua função (BOBULESCU, 2010; KIM *et al.*, 2013; MARIC-BILKAN, 2013; OGAWA *et al.*, 2009).

Em relação ao perfil inflamatório, demonstramos redução da inflamação renal, com aumento da expressão de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, e diminuição da expressão de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, em camundongos obesos tratados com óleo de capivara livre (5000 mg/ kg) ou em nanoemulsão. O TNF- α é um importante mediador da inflamação e um importante participante na patogênese da lesão renal, promovendo apoptose por inflamação e o acúmulo de matriz extracelular, reduzindo a taxa de filtração glomerular e aumentando a permeabilidade à albumina (LEE; CHOI, 2015). A IL-10 é uma citocina com importantes propriedades anti-inflamatórias, como inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulação de células anti-inflamatórias, como células T reguladoras e macrófagos (MOORE *et al.*, 2001). Uma deficiência na expressão de IL-10 pode piorar o desenvolvimento da DRC através da progressão da aterosclerose (GEORGE *et al.*, 2004).

Para avaliação da função renal, foram analisados os níveis urinários de creatinina e proteína. A creatinina é um importante marcador da função renal e é derivada principalmente do metabolismo da creatina muscular sendo excretada inteiramente pela urina. Portanto, seu nível urinário diminui quando há deficiência na capacidade de filtração renal, sugerindo que há dano aos néfrons (ABENSUR, 2011). Além disso, a presença de proteína na urina, denominada proteinúria, é tóxica para os túbulos e pode causar inflamação tubulointersticial e está associada a danos ao rim por meio da estimulação de efeitos pró-inflamatórios. Sendo assim, este marcador bioquímico é considerado um forte parâmetro para identificar a progressão da DRC (GORRIZ; MARTINEZ-CASTELAO, 2012). No nosso estudo, os animais do grupo HL apresentaram diminuição da excreção de creatinina e aumento da proteinúria. O tratamento com óleo de capivara livre (5000 mg/ Kg) apresentou uma tendência de aumento da excreção de creatinina e diminuição da proteinúria, porém somente o tratamento com nanoemulsão foi capaz de reverter significativamente seus níveis. Portanto, esses dados indicam que somente o tratamento com nanoemulsão contendo óleo de capivara foi capaz de melhorar a função renal de camundongos obesos.

A excreção urinária de proteínas, como a albumina, causa doenças glomerulares como lesão de podócitos, glomeruloesclerose por hipertrofia mesangial e disfunção das células endoteliais vasculares (JEFFERSON *et al.*, 2008). A barreira de filtração glomerular consiste em três camadas: o epitélio glomerular, a lâmina basal e os diafragmas em fenda. Os diafragmas em fenda são formados pelos prolongamentos secundários dos podócitos, os pedicelos, e impedem a passagem de proteínas para o filtrado urinário (GARG, 2018). Portanto, como resultado da lesão podocitária e pedicelos, os diafragmas em fenda se rompem e ocorre um aumento da excreção urinária de proteínas. Através do microscópio eletrônico de transmissão e varredura, nossos resultados indicaram que o grupo HL apresentou alterações ultraestruturais, como descontinuidade dos poros dos capilares glomerulares fenestrados e espessamento da lâmina basal glomerular, além de tamanhos variáveis e irregulares dos pedicelos, prejudicando então, o funcionamento da barreira de filtração. Os diferentes tratamentos com óleo de capivara livre (5000 mg/ Kg) ou em nanoemulsão foram capazes de induzir um remodelamento benéfico da morfologia dos pedicelos e melhorar a integridade da MBG.

O papel da desregulação lipídica na indução de lesão renal em indivíduos obesos tem sido amplamente relatado (WEINBERG, 2006). Nossos achados corroboram Weinberg (2006), uma vez que foi observado um aumento dos níveis de CT, LDL, VLDL e TG nos grupos HL, HL+OC100 e HL+NB, indicando alteração do perfil lipídico. O tratamento com óleo de capivara tanto em sua forma livre quanto em nanoemulsão foi capaz de reduzir os níveis de CT, LDL e VLDL. Porém somente o grupo obeso tratado com nanoemulsão de óleo de capivara foi capaz de diminuir os níveis de TG significativamente, demonstrando um efeito mais eficaz do tratamento com nanoemulsão. Indivíduos obesos apresentam quadros de dislipidemia, com aumento da secreção de LDL e VLDL e diminuição de HDL, possivelmente devido às alterações nos níveis lipídicos que a obesidade promove (STANHOPE *et al.*, 2009). Nossos resultados evidenciaram um aumento dos níveis de HDL nos grupos hiperlipídicos tratados com óleo de capivara livre e em nanoemulsão, sugerindo uma melhora do perfil lipídico.

Apesar dos crescentes relatos associando obesidade e altas cargas lipídicas com insuficiência renal, o mecanismo molecular que governa o desenvolvimento da disfunção renal, bem como seus alvos terapêuticos não são totalmente elucidados. Portanto, é uma necessidade explorar novos potenciais terapêuticos para prevenir e/ou reverter os efeitos nocivos da obesidade e alterações fisiopatológicas renais.

Diversos trabalhos já publicados referem-se aos efeitos benéficos da suplementação de óleos de origem animal em modelos de obesidade, especialmente aqueles ricos em PUFA

(LANZA, *et al.*, 2013; GO, *et al.*, 2016). Os mecanismos pelos quais os PUFA são benéficos para a obesidade e consequentes lesões não estão bem elucidados, porém estudos indicam que esses AGs têm efeitos sobre a regulação de proteínas de função quinase e precursores de PGs, leucotrienos e tromboxanos (BRADDOCK *et al.*, 2002).

No rim, a via COX é a principal síntese de PGs em túbulos contorcidos distais e interfere no metabolismo de sódio e água. As funções fisiológicas renais dos glomérulos, como a filtração do sangue, são parcialmente dependentes da via enzimática COX e de seus produtos, como os eicosanoides, que ativam a regulação do tônus vascular e a homeostase de sal e água pela modulação da hemodinâmica glomerular, assim como atua no ajuste da função do néfron distal (EO *et al.*, 2017). Como os eicosanoides são produtos derivados do metabolismo de AGs, vários estudos recentes apontam para a possível aplicação de abordagens dietéticas na prevenção e tratamento de doenças com cunho inflamatório, como a doença renal associada à obesidade (MATTIX; BADR, 2000; HAO; BREYER, 2008).

Estudos com o óleo de peixe relacionam seus efeitos benéficos em animais alimentados com dieta HL (LANZA *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2010; TISHINSKY *et al.*, 2012). No entanto, a produção comercial de óleos ricos em n-3 tem dependido principalmente de óleos de peixe marinho, apesar de sua aplicação muitas vezes ser dificultada por variações sazonais, poluição marinha e a crescente demanda por óleos de peixe já não é sustentável (GO *et al.*, 2016). No cenário atual, o estudo do óleo de capivara refere-se à melhor maneira de utilizar os subprodutos da capivara, uma vez que o consumo de sua carne está crescendo a cada dia no Brasil, tendo boa aceitação no mercado, além de ser rico em PUFA (MARINHO *et al.*, 2013). Nesse sentido, o óleo de capivara se apresenta como uma alternativa terapêutica promissora para tratar as alterações metabólicas impostas pela obesidade, uma vez que esse óleo é rico em PUFA, conforme evidenciado na caracterização química neste trabalho.

O consumo de PUFA apresenta diversos benefícios, como prevenção de doenças cardiovasculares, melhora da função cerebral, redução da pressão arterial e do colesterol (WALKER *et al.*, 2013; KARGAR *et al.*, 2011). Em estudos anteriores, a suplementação com óleo de peixe em ratos espontaneamente hipertensos diminuiu a PAS e a área de injúria renal, além de reduzir as concentrações de CT e TG desses indivíduos. A melhora no padrão lipídico por meio dessa suplementação é um dos fatores protetores cardíacos e renais encontrados em pacientes hipertensos (DIAZ ENCARNACIÓN *et al.*, 2008). Adicionalmente, Kasiske *et al.* (1991) demonstraram que a suplementação com óleo de peixe reduziu a albuminúria, a expansão mesangial e a glomeruloesclerose em ratos diabéticos, além de diminuição dos TG e

CT e aumento de HDL. Sendo assim, a suplementação com n-3 foi capaz de amenizar ou melhorar o quadro progressivo de injúria renal.

Apesar de haver poucos trabalhos na literatura com óleo de capivara, nosso grupo demonstrou que esta fonte alternativa de PUFA, foi capaz de reverter o dano hepático associado à doença hepática gordurosa não alcoólica (MARINHO *et al.*, 2018) e melhorou o processo de cicatrização de feridas em um modelo de camundongo suíço (MARINHO *et al.*, 2013). Diversos trabalhos já publicados observaram efeitos benéficos da suplementação de óleos de origem animal em modelos de obesidade, especialmente aqueles ricos em PUFA's essenciais, como o óleo de peixe, principalmente por seus proeminentes efeitos anti-obesogênicos (GO *et al.*, 2016; LANZA *et al.*, 2013).

Em relação a análise química do óleo de capivara, foi observado que este possui maior concentração de diversos AGs em relação ao óleo de peixe, como os ácidos oleico e linoleico, ácido palmítico e esteárico, com exceção do ácido mirístico que foi encontrado em menor concentração. No entanto, não foi possível analisar a concentração de n-3, uma vez que o custo para obtenção do padrão n-3 é mais elevado comparado aos demais ácidos graxos analisados. Consequentemente, não foi possível obter a curva de referência para comparar com o perfil da amostra. Os ácidos palmítico, esteárico e mirístico são considerados AGs saturados e estão envolvidos no processo de resposta pró-inflamatória na obesidade e resistência à insulina. Concomitantemente, há a liberação do fator de transcrição NF- κ B, culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 (PALOMER *et al.*, 2018). Contudo, uma dieta rica em PUFA's com alto teor de AGs n-3, como EPA e DHA, apresenta significantes propriedades anti-inflamatórias através da inibição de eicosanóides pró-inflamatórios derivados dos PUFA's n-6, como os derivados do AA, e a diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Os AGs n-3 competem com os n-6 na incorporação de membranas celulares pela ação da COX (CALDER, 2006). O ácido oleico é responsável por produzir derivados pró-inflamatórios do AA, como leucotrienos. Entretanto, o ácido ALA (n-3) é responsável pela produção de DHA e EPA, precursores de resolvinas, protectinas, maresinas e lipoxinas, que possuem um importante papel anti-inflamatório modulando a quimiotaxia de neutrófilos, aumentando a capacidade fagocítica dos leucócitos e reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IZAOLA *et al.*, 2011). Além disso, estudos anteriores demonstraram que o EPA suprimiu a expressão TNF- α em células monocíticas humanas (DUSING *et al.*, 1990), o que foi parcialmente devido à inibição da ativação do NF- κ B. Em um estudo usando um modelo de obstrução ureteral unilateral de rato, a administração de PUFA's n-3 diminuiu IL-1, proteína quimioatraente de monócitos 1,

proteína inflamatória de macrófagos 1 e TGF- β no tecido renal (FRIEDMAN; MOE, 2006). Apesar de não ter sido possível realizar a análise da concentração de n-3 na amostra, nossos resultados sugerem que o óleo de capivara possui alta concentração do mesmo, uma vez que apresentou efeitos benéficos no perfil inflamatório e fibrótico.

No entanto, a configuração dos PUFA's pode levar a mudanças estruturais, uma vez que são ácidos instáveis e propensos a oxidação, isomerização e polimerização. Essas mudanças ocorrem porque o hidrogênio ligado a um carbono adjacente de duas ligações duplas possui menor energia de dissociação, facilitando o processo de abstração (HOGG; KALYANARAMAN, 1999). Uma vez que PUFA's são sensíveis à degradação oxidativa, a produção de alimentos enriquecidos com concentrados de PUFA's, como o óleo de capivara, se torna desafiador. Uma alternativa para retardar a oxidação, evitar a perda da taxa metabólica e consequentemente aumentar a biodisponibilidade, é a nanotecnologia (KARGAR *et al.*, 2011; ZIMET; LIVNEY, 2009). As nanocápsulas lipídicas são sistemas transportadores coloidais desenvolvidos para encapsular, proteger e fornecer componentes lipofílicos em alimentos e suplementos (MOOMAND; LIM, 2014).

A composição e estrutura de nanossistemas apresentam diferentes propriedades e diversas possibilidades de aplicações. Dentre os materiais empregados com a finalidade de entrega de fármacos, há as nanoemulsões (JEE *et al.*, 2006). A utilização da nanoemulsão apresenta diversos benefícios em relação às demais aplicações. Estudos anteriores indicaram que a utilização de nanoemulsão contendo óleo de peixe ocasionou:

- a) aumento da permeabilidade nas membranas de fosfolipídios, otimizando os efeitos moduladores da inflamação relacionados aos AGs presentes nos óleos de peixe (AHMAD *et al.*, 2020);
- b) melhora da absorção de moléculas hidrofóbicas do óleo de peixe pela via de administração oral (SANTOS *et al.*, 2020);
- c) proteção química dos ativos dos PUFA's dentro da nanoemulsão (WALKER *et al.*, 2014).

Por estas razões, a administração do óleo de capivara em nanoemulsão se apresentou como um tratamento mais eficaz nas alterações causadas pela obesidade. Neste trabalho administramos o óleo de capivara em nanoemulsão na dose de 100 mg/ Kg e o óleo livre em duas doses diferentes (5000 mg/ Kg e 100 mg/ Kg). O tratamento com óleo livre na dose de 100 mg/ Kg, mesma dose utilizada na nanoemulsão, não foi capaz de melhorar nenhum dos parâmetros analisados.

Nosso estudo demonstrou de maneira inédita que tanto o óleo de capivara livre (5000 mg/ Kg) como em nanoemulsão diminuem as lesões fisiopatológicas renais causadas pela obesidade. Porém, somente o tratamento com nanoemulsão melhorou a função renal e a resistência à insulina, além de diminuir significativamente os níveis de MC. Além disso, a dose utilizada do óleo de capivara na nanoemulsão é 50 vezes menor do que a aplicada em sua forma livre, possibilitando diminuição de possíveis efeitos adversos, redução na toxicidade e maior adesão do paciente à terapêutica, sendo este um importante aspecto em doenças crônicas onde, geralmente, o tratamento é prolongado (FARAJI; WIPF, 2009).

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos achados demonstraram que tanto o tratamento com óleo de capivara livre na dose de 5000 mg/ kg quanto em nanoemulsão na dose de 100 mg/kg promoveram redução da PAS, restabelecimento do parênquima renal e dos parâmetros lipídicos, diminuição do estresse oxidativo e expressão de citocinas pró-inflamatórias no córtex renal de camundongos obesos com doença renal. Além disso, ambos os tratamentos foram capazes de restaurar os níveis de α -SMA e TGF- β , com consequente diminuição da fibrose renal. No entanto, somente o tratamento com nanoemulsão de óleo de capivara foi capaz de reduzir a MC e os níveis de glicose plasmática, assim como melhorar a função renal. Sendo assim, nossos achados sugerem que o tratamento com nanoemulsão de óleo de capivara é mais eficaz no tratamento das alterações renais decorrentes da obesidade, uma vez que foi capaz de promover melhora em todos os parâmetros, além de ser administrado em dose menor. Logo, o tratamento com nanoemulsão não é apenas uma alternativa terapêutica capaz de reduzir a PAS, mas também possui efeitos benéficos sobre a estrutura e ultraestrutura do rim, melhorando os efeitos sistêmicos e locais causados pela obesidade.

REFERÊNCIAS

- ABENSUR, H. **Biomarcadores na nefrologia**. Roche. 2011.
- APOVIAN, C. M.; GOKCE, N. Obesity and cardiovascular disease. **Circulation**, v.125, n.9. p.1178-1182, 2012.
- AHMAD, M. Z.; AHMAD, J.; ZAFAR, S. *et al.* Omega-3 fatty acids as adjunctive therapeutics: prospective of nanoparticles in its formulation development. **Ther Deliv.**, v.11, n.1, p.851-868, 2020.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.
- ALBRACHT-SCHULTE, K; KALUPAHANA, N. S.; RAMALINGAM, L. *et al.* Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. **J Nutr Biochem**. v.58, p.1-16, 2018. DOI:10.1016/j.jnutbio.2018.02.012.
- ALGHAMDI, T. A.; MAJUMDER, S.; THIEME, K. *et al.* Janus Kinase 2 Regulates Transcription Factor EB Expression and Autophagy Completion in Glomerular Podocytes. **J Am Soc Nephrol.**, v.28, n.9, p.2641-2653, 2017.
- AN, W. S. *et al.* Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v.297, n.4, p.895-903, 2009.
- BARBOSA, K. B. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n.4, p.629-643, 2010.
- BARNES, J. L.; GLASS, I. Renal interstitial fibrosis: a critical evaluation of the origin of myofibroblasts. **Contrib Nephrol.**, v.169, p.73-93, 2011. DOI:10.1159/000313946.
- BAYS, H. Clinical overview of Omacor: a concentrated formulation of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Am J Cardiol.**, v.98, n.4, 71-76, 2006.
- BELLANTI F. *et al.* Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Free Radic Biol Med.**, v.111, p.173-185, 2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.023
- BERNARDI, F. Comportamento de restrição alimentar e obesidade. **Rev Nutr**, v. 18, n. 1, p. 85-93, 2005.
- BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nat Rev Endocrinol.**, v.15, n.5, p.288-298, 2019.
- BOBULESCU, I. A. *et al.* Triglycerides in the human kidney cortex: relationship with body size. **PLoS One**, v.9, n.8, e101285, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0101285.

BOBULESCU, I. A. Renal lipid metabolism and lipotoxicity. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.19, n.4, p.393-402, 2010.

BÖRGESON, E. *et al.* Lipoxin A4 Attenuates Obesity-Induced Adipose Inflammation and Associated Liver and Kidney Disease. **Cell Metab.**, v.22, n.1, p.125-137, 2015.

BÖTTINGER, E. P. TGF-beta in renal injury and disease. **Semin Nephrol.**, v.27, n.3, p. 309-320, 2007.

BRADDOCK, R. *et al.* gamma-Linoleic acid and ascorbic acid ameliorate the effects of experimental diabetes on electrolyte and bone homeostasis in pregnant rats. **J Endocrinol.**, v.173, n.2, p.273-284, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BRENNAN, E. *et al.* Pro-resolving lipid mediators: regulators of inflammation, metabolism and kidney function. **Nat Rev Nephrol.**, v.17, n.11, p.725-739, 2021.

BRIFFA, J. F. *et al.* Adipokines as a link between obesity and chronic kidney disease. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v.305, n.12, p.1629-1636, 2013.

BUETTNER, R. *et al.* Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol.**, v.36, n.3, p.485-501, 2006.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v.15, n.4, p.798-808, 2007.

CALDER, P. C. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **Am J Clin Nutr.**, v.83, n.6, p.1505-1519, 2006.

CÂMARA, N. O. *et al.* Kidney disease and obesity: epidemiology, mechanisms and treatment. **Nat Rev Nephrol.**, v.13, n.3, p.181-190, 2017.

CHAAR, L. J. *et al.* High-fat diet-induced hypertension and autonomic imbalance are associated with an upregulation of CART in the dorsomedial hypothalamus of mice. **Physiol Rep.**, v.4, n.11, e12811, 2016.

CHEN, B. H.; STEPHEN, I. B. Nanoemulsion and Nanoliposome Based Strategies for Improving Anthocyanin Stability and Bioavailability. **Nutrients**, v.11, n.5, p.1052, 2019. doi:10.3390/nu11051052.

CHEN, Y. *et al.* ATP-citrate lyase is an epigenetic regulator to promote obesity-related kidney injury. **FASEB J.**, v.33, n.8, p. 9602-9615, 2019.

CHIN, H. J. *et al.* Omacor, n-3 polyunsaturated fatty acid, attenuated albuminuria and renal dysfunction with decrease of SREBP-1 expression and triglyceride amount in the kidney of type II diabetic animals. **Nephrol Dial Transplant.**, v.25, n.5, p.1450-1457, 2010.

CHO, M. H. Renal fibrosis. **Korean J Pediatr.**, v.53, n.7, p.735-740, 2010.

COHEN, J. B.; COHEN, D. L. Cardiovascular and renal effects of weight reduction in obesity and the metabolic syndrome. **Current hypertension reports.**, v.17, n.5, p.34, 2015.
DOI:10.1007/s11906-015-0544-2

Collaboration NCDRF. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet.**, v.387, n.10026, p.1377-96, 2016.

COUVREUR, P. *et al.* Nanocapsule technology: a review. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.**, v.19, n.2, p.99-134, 2002.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharm Res.**, v.23, n. 7, p.1417-1450, 2006.

D'AGATI, V. D. *et al.* Obesity-related glomerulopathy: clinical and pathologic characteristics and pathogenesis. **Nat Rev Nephrol.**, v.12, n.8, p.453-471, 2016.

D'ALMEIDA, A. P. L. *et al.* α -bisabolol-loaded lipid-core nanocapsules reduce lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. **Int J Nanomedicine.**, v.12, p.4479-4491, 2017. DOI:10.2147/IJN.S130798.

DE OLIVEIRA, B. R. *et al.* Diagnostic performance of body mass index in detection of obesity using different cutoff points for excess body fat. **Nutrition.**, v.79,110950, 2020. DOI: 10.1016/j.nut.2020.110950.

DE VRIES, A. P. *et al.* Fatty kidney: emerging role of ectopic lipid in obesity-related renal disease. **Lancet Diabetes Endocrinol.**, v.2, n.5, p.417-426, 2014.

DEJI, N. *et al.* Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v.296, n.1, 118-126, 2009.

DEMARCO, V. G.; AROOR, A. R.; SOWERS, J. R. The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. **Nat Rev Endocrinol.**, v.10, n.6, p.364-376,2014

DIAZ ENCARNACION, M. M.*et al.* Signaling pathways modulated by fish oil in salt-sensitive hypertension. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v.294, n.6, p.1323-1335, 2008.

DÜSING, R. *et al.* Effects of n-3 fatty acids on renal function and renal prostaglandin E metabolism. **Kidney Int.**, v.38, n.2, p.315-319, 1990.

ECKARDT, K. U. *et al.* Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. **Lancet**, v.382, n.9887, p.158-169, 2013.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chem Soc Rev.**, v.41, n.7, p.2545-2561, 2012.

EO, H. *et al.* Ameliorative Effect of Ecklonia cava Polyphenol Extract on Renal Inflammation Associated with Aberrant Energy Metabolism and Oxidative Stress in High Fat Diet-Induced Obese Mice. **J Agric Food Chem.**, v.65, n.19, p.3811-3818, 2017.

ESQUERDO, V. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of nanoemulsions containing unsaturated fatty acid concentrate-chitosan capsules. **J Colloid Interface Sci.**, v.445, p.137-142, 2015. DOI: 10.1016/j.jcis.2014.12.094.

ESQUINAS, P. *et al.* Structural and ultrastructural renal lesions in rats fed high-fat and high-phosphorus diets. **Clin Kidney J.**, v.14, n.3, p.847-854, 2020.

FANG, Q. *et al.* Inhibition of mitogen-activated protein kinases/nuclear factor κ B-dependent inflammation by a novel chalcone protects the kidney from high fat diet-induced injuries in mice. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.355, n.2, p.235-246, 2015.

FARAJI, A. H; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorg Med Chem.**, v.17, n.8, p.2950-2962, 2009.

FEDERICO, P.; CANZIANI, G. A. Modeling the population dynamics of capybara *Hydrochaeris hydrochaeris*: a first step towards a management plan. **Ecological Modelling**, v.186, n.1, p.111–121, 2005.

FELDMAN, D. L. *et al.* Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2)27 rats. **Hypertension.**, v.52, n.1, p.130-136, 2008.

FLACHS, P. *et al.* Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. **Clin Sci.**, v.116, n.1, p.1-16, 2009.

Foster-Schubert KE, Cummings DE. Emerging therapeutic strategies for obesity. **Endocr Rev.** v.27, n.7, p.779-793, 2006. DOI:10.1210/er.2006-0041.

FRAULOB, J. C. *et al.* Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet. **Clin Sci**, v.123, n.4, p.259-270, 2012.

FRIEDMAN, A.; MOE, S. Review of the effects of omega-3 supplementation in dialysis patients. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v.1, n.2, p.182-192, 2006.

FUJIKAWA, M. *et al.* Effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester on albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Nutr Sci Vitaminol**, v.40, n. 1, 49-61, 1994.

FUKUSHIMA, M. *et al.* Comparative hypocholesterolemic effects of capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris dabbeni*) oil, horse oil, and sardine oil in cholesterol-fed rats. **Lipids.**, v.32, n.4, p.391-395, 1997.

GAI, Z. *et al.* Lipid Accumulation and Chronic Kidney Disease. **Nutrients.**, v.11, n.4, p.722, 2019. DOI:10.3390/nu11040722.

- GANCHEVA, S. *et al.* Interorgan Metabolic Crosstalk in Human Insulin Resistance. **Physiol Rev.**, v.98, n.3, p.1371-1415, 2018.
- GARMAN, J. H. *et al.* Omega-3 fatty acid rich diet prevents diabetic renal disease. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v.296, n.2, 306-316, 2009. DOI:10.1152/ajprenal.90326.2008.
- GEORGE, S. *et al.* Renovascular disease is associated with low producer genotypes of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10. **Tissue Antigens**, v.63, n.5, p.470-475, 2004.
- GIRARDI, F., *et al.* Proximate composition and fatty acid profile of semi confined young capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris* L. 1766) meat. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 7, p. 647–654, 2005.
- GO, R. E. *et al.* Effects of microalgal polyunsaturated fatty acid oil on body weight and lipid accumulation in the liver of C57BL/6 mice fed a high fat diet. **J Biomed Res.**, v.30, n.3, p.234-242, 2016.
- GONZALEZ-MUNIESA, P. *et al.* Obesity. **Nature reviews Disease primers**, v.3, n. 17034, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.34
- GORRIZ, J. L.; MARTINEZ-CASTELAO, A. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression. **Transplant Rev**, v.26, n.1, p.3-13, 2012.
- HALL, J. E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. **Mol Biotechnol.**, v.24, n.1, p.27-39, 2003.
- HAO, C. M.; BREYER, M. D. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. **Annu Rev Physiol.**, v. 70, p.357-377, 2008. DOI: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100614.
- HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutr Res Rev.**, v.23, n.2, p.270-299, 2010.
- HERMAN-EDELSTEIN, M. *et al.* Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy. **J Lipid Res.**, v.55, n.3, p.561-572, 2014.
- HIRAHASHI, J. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids for the Treatment of IgA Nephropathy. **J Clin Med.**, v.6, n.7, p.70, 2017. DOI:10.3390/jcm6070070
- HOET, P. H., BRÜSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles - known and unknown health risks. **J Nanobiotechnology**, v.2, n.1, p. 1-15, 2004.
- HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochim Biophys Acta**, v.141, n.2, p.378-384, 1999.
- HSU, C. Y. *et al.* Body mass index and risk for end-stage renal disease. **Ann Intern Med.** v.144, n.1, p.21-28, 2006.
- KASISKE, B. L. *et al.* Impact of dietary fatty acid supplementation on renal injury in obese Zucker rats. **Kidney International**, v.39, p.1125-1134, 1991.

INNES, J. K.; CALDER, P. C. Marine Omega-3 (N-3) Fatty Acids for Cardiovascular Health: An Update for 2020. **Int J Mol Sci.** v.21, n.4, p.1-21, 2020.

IZAOLA, O. *et al.* Inflamación y obesidad (lipoinflamación). **Nutr Hosp.**, v.31, n.6, 2352-2358, 2015.

JÄGER, E. *et al.* Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **J Biomed Nanotechnol.**, v.5, n.1, p.130-140, 2009.

JEE, J. P. *et al.* Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. **Eur J Pharm Biopharm.**, v.63, n.2, p.134-139, 2006.

JEFFERSON, J. A.; SHANKLAND, S. J.; PICHLER, R. H. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. **Kidney Int.**, v.74, n.1, p.22-36, 2008.

JIA, Q. *et al.* Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid, but not alpha-linolenic acid, suppress deoxynivalenol-induced experimental IgA nephropathy in mice. **J Nutr.**, 2004;134(6):1353-1361, 2004.

JIA, Q. *et al.* Docosahexaenoic acid attenuates mycotoxin-induced immunoglobulin a nephropathy, interleukin-6 transcription, and mitogen-activated protein kinase phosphorylation in mice. **J Nutr.**, v.134, n.12, p.3343-3349, 2004.

JIANG, T. *et al.* Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. **J Biol Chem.** v.280, n. 37, p.32317-32325, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MOOMAND, K.; LIM, L. T. Oxidative stability of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres. **Food Res. Int.**, v. 62, p.523–532, 2014. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.03.054

Kaissling B, Lehir M, Kriz W. Renal epithelial injury and fibrosis. **Biochim Biophys Acta.** v.1832, n.7, p.931-939, 2013.

KAMALY, N. *et al.* Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. **Chem Soc Rev.**, v.41, n.7, p.2971-3010, 2012.

KAMBHAM, N. *et al.* Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. **Kidney Int.**, v.59, n.4, p.1498-1509, 2001.

KAMEI, N. *et al.* Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. **J Biol Chem.**, v.281, n.36, p.26602-26614, 2006.

KANG, H. M. *et al.* Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. **Nat Med.**, v.21, n.1, p.37-46, 2015.

- KAPOOR, B. *et al.* Dietary Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Uses and Potential Health Benefits. **Curr Nutr Rep.**, v.10, n.3, p.232-242, 2021.
- KARGAR, M.; SPYROPOULOS, F.; NORTON, I. T. The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. **J Colloid Interface Sci.**, v.357, n.2, p.527-533, 2011.
- KATAKURA, M. *et al.* Chronic Arachidonic Acid Administration Decreases Docosahexaenoic Acid- and Eicosapentaenoic Acid-Derived Metabolites in Kidneys of Aged Rats. **PLoS One**, v.10, n.10, e0140884, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0140884.
- KATAKURA, M. *et al.* Omega-3 fatty acids protect renal functions by increasing docosahexaenoic acid-derived metabolite levels in SHR.Cg-Lepr(cp)/NDmcr rats, a metabolic syndrome model. **Molecules.**, v.19, n.3, p.3247-3263, 2014.
- KATAKURA, M. *et al.* Omega-3 fatty acids protect renal functions by increasing docosahexaenoic acid-derived metabolite levels in SHR.Cg-Lepr(cp)/NDmcr rats, a metabolic syndrome model. **Molecules.**, v.19, n. 3, p.3247-3263, 2014.
- KATSOULIERIS, E. *et al.* Lipotoxicity in renal proximal tubular cells: relationship between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress pathways. **Free Radic Biol Med.**, v.48, n.12, p.1654-1662, 2010.
- KELLY, D. J. *et al.* Aliskiren, a novel renin inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats. **Diabetologia**, v.50, n.11, p.2398-2404, 2007.
- KENNEDY-FEITOSA, E. *et al.* Eucalyptol attenuates cigarette smoke-induced acute lung inflammation and oxidative stress in the mouse. **Pulm Pharmacol Ther.**, v.41, p.11-18, 2016. DOI:10.1016/j.pupt.2016.09.004.
- KIELAR, M. L. *et al.* Docosahexaenoic acid ameliorates murine ischemic acute renal failure and prevents increases in mRNA abundance for both TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase. **J Am Soc Nephrol.**, v.14, n. 2, p.389-396, 2003.
- KIM, J. E. *et al.* Celastrol, an NF- κ B inhibitor, improves insulin resistance and attenuates renal injury in db/db mice. **PLoS One**, v.8, n.4, e62068, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0062068.
- KOVESDY, C. P.; FURTH, L. S.; ZOCCALI, C. World Kidney Day Steering Committee. Obesity and kidney disease: hidden consequences of the epidemic. **Clin Kidney J.**, v.10, n.1, p.1-8, 2017.
- KRIZ, W.; KAISSLING, B.; LE HIR, M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? **J Clin Invest.**, v.121, n.2, p.468-474, 2011.
- KUME, S. *et al.* Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. **J Am Soc Nephrol.**, v.18, n.10, p.2715-2723, 2007.

LANZA, I. R. *et al.* Influence of fish oil on skeletal muscle mitochondrial energetics and lipid metabolites during high-fat diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.304, n.12, p.1391-1403, 2013.

LEE, S. Y.; CHOI, M. E. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria. **Pediatr Nephrol.**, v.30, n.7, p.1063-1075, 2015.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2018.

LI, J. *et al.* High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. **Exp Anim.**, v.69, n.3, p.326-335, 2020.

LIN, Y. L. *et al.* Omega-3 Fatty Acids Improve Chronic Kidney Disease-Associated Pruritus and Inflammation. **Medicina**, v.58, n.6, p.796, 2022.

LIU Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. **J Am Soc Nephrol.**, v.21, n.2, p.212-222, 2010

MARIC-BILKAN, C. Obesity and diabetic kidney disease. **Med Clin North Am.**, v.97, n.1, p.59-74, 2013.

MARIEE, A. D.; ABD-ELLAH, M. F. Protective effect of docosahexaenoic acid against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats: a possible mechanism of action. **Ren Fail.**, v.33, n.1, p.66-71, 2011.

MARINHO, P. C.; NETO FERREIRA, R.; JOSÉ DE CARVALHO, J. Evaluation of therapeutic intervention with a natural product in cutaneous wound healing: the use of capybara oil. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2013, 217198, 2013. DOI:10.1155/2013/217198.

MARINHO, P. C. *et al.* Capybara Oil Improves Hepatic Mitochondrial Dysfunction, Steatosis, and Inflammation in a Murine Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v.2018, 4956079, 2018. DOI:10.1155/2018/4956079.

MARSHALL, C. B. Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: adaptive or pathogenic? **Am J Physiol Renal Physiol.**, v.311, n.5, p.831-843, 2016.

MASEK, J.; FABRY, P. High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia*, v.15, p. 444-445, 1959. DOI:10.1007/BF02157708.

MATRAVADIA, S. *et al.* Both linoleic and α -linolenic acid prevent insulin resistance but have divergent impacts on skeletal muscle mitochondrial bioenergetics in obese Zucker rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.307, n.1, p.102-114, 2014.

MATTIX, H. J.; BADR, K. F. Arachidonic acid metabolites and the kidney. In: BRENNER, B.M. (Ed.) **The kidney**. 6th. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion-based oral delivery systems for lipophilic bioactive components: nutraceuticals and pharmaceuticals. **Ther Deliv.**, v.4, n.7, p.841-857, 2013.

MEIER, M. *et al.* Deletion of protein kinase C-epsilon signaling pathway induces glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis in vivo. **J Am Soc Nephrol.**, v.18, n.4, p.1190-1198, 2007.

MENDONÇA, C. P.; DOS ANJOS, L. A. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. **Cad Saude Publica**, v.20, n.3, p.698-709, 2004.

MIN, H. S. *et al.* Effects of Toll-like receptor antagonist 4,5-dihydro-3-phenyl-5-isoxasole acetic acid on the progression of kidney disease in mice on a high-fat diet. **Kidney Res Clin Pract.**, v.33, n.1, p.33-44, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde; IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde (PNS)**. 2019. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; IBGE, 2019.

MOLFINO, A. *et al.* Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Critical Illness: Anti-Inflammatory, Proresolving, or Both? **Oxid Med Cell Longev.** 2017;2017:5987082. DOI:10.1155/2017/5987082.

MOLOFSKY, A. B. *et al.* Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. **J Exp Med.**, v.210, n.3, p.535-549, 2013.

MOORE, K. W. *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.

MOUNT, P. *et al.* Obesity-Related Chronic Kidney Disease-The Role of Lipid Metabolism. **Metabolites**, v.5, n.4, p.720-732, 2015.

MUNDEL, P.; REISER, J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? **Kidney Int.** v.77, n.7, p.571-580, 2010.

MURAMATSU, H. *et al.* Influence of Polyunsaturated Fatty Acid Intake on Kidney Functions of Rats with Chronic Renal Failure. **Mar Drugs.**, v.19, n.12, p.692, 2021.

NAGAMOTO, T.; EGUCHI, G.; BEEBE, D. C. Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v.41, n.5, p.1122-1129. 2000.

NASCIMENTO, F. A. *et al.* Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). **Exp Toxicol Pathol.**, v.62, n.1, p.17-25, 2010.

NAYLOR, R. W.; MORAIS, M. R. P. T.; LENNON, R. Complexidades da membrana basal glomerular. **Nat Rev Nephrol.**, v.17, p.112–127, 2021. DOI:10.1038/s41581-020-0329-y.

NISHIMURA, S. *et al.* CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nat Med.**, v.15, n.8, p.914-920, 2009.

NISHIMURA, S. *et al.* Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. **Cell Metab.**, v.18, n.5, p.759-766, 2013.

NUSSBERGER, J. *et al.* Plasma renin and the antihypertensive effect of the orally active renin inhibitor aliskiren in clinical hypertension. **Int J Clin Pract.**, v.61, n.9, p.1461-1468, 2007.

OGAWA, S. *et al.* Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers Reduce Urinary Angiotensinogen Excretion and the Levels of Urinary Markers of Oxidative Stress and Inflammation in Patients with Type 2 Diabetic Nephropathy. **Biomark Insights.**, v.4, p.97-102, 2009. DOI: 10.4137/bmi.s2733.

OLIVEIRA, L. P. *et al.* Fatores associados a excesso de peso e concentração de gordura abdominal em adultos na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cad Saude Publica**, v.25. n.3, p. 570-582, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Obesity and overweight, WHO fact sheet 311 World Health Organization Website. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 1 jun. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization, 2000. 252p. (Technical Report Series 894)

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World health statistics: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals.** Geneva: WHO, 2016. 121p.

PALOMER, X. *et al.* Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. **Trends Endocrinol Metab.**, v.29, n.3, p.178-190, 2018. .

PANAHI, Y. *et al.* Therapeutic Effects of Omega-3 Fatty Acids on Chronic Kidney Disease-Associated Pruritus: a Literature Review. **Adv Pharm Bull.**, v.6, n.4, p.509-514, 2016. doi:10.15171/apb.2016.064.

PARINYASIRI, U. *et al.* Effect of fish oil on oxidative stress, lipid profile and renal function in IgA nephropathy. **J Med Assoc Thai.**, v.87, n.2, p.143-149, 2004.

PATRAKKA, J.; TRYGGVASON, K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.396, n.1, p.164-169, 2010.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P.; LANCHA, J. R. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência a Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.47, n.2, p.111-27, 2003.

PERINI, J. A. L.; STEVANATO, F. B.; SARGI, S. C. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Rev. Nutr.**, v. 23, n.6, p. 1075-1086, 2010.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod.**, v.63, n.7, p.1035-1042, 2000.

PINHEIRO, M. S. **A criação em sistema semi-intensivo e o manejo sustentável de capivaras na natureza.** Pelotas: Embrapa, 2008. (Documentos 232).

PINHEIRO, M. S. *et al.* **Utilização sustentável e domesticação da capivara**. Pelotas: Embrapa, v 31, 2001. 86p.

POSTIC, C.; GIRARD, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. **J Clin Invest.**, v.118, n.3, p.829-838, 2008.

RE, R. N. Obesity-related hypertension. **Ochsner J.**, v.9, n.3, p.133-136, 2009

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr.**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993. doi:10.1093/jn/123.11.1939.

RIELLA, M. C. **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólitos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

ROMIEU, I. *et al.* Energy Balance and Obesity. what are the main drivers? **Cancer Causes Control**, v.28, n.3, p.247–258, 2017.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: Texto e Atlas**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

RUAN, X. Z.; VARGHESE, Z.; MOORHEAD, J. F. An update on the lipid nephrotoxicity hypothesis. *Nat Rev Nephrol.*, v.5, n.12, p.713-721, 2009.

RÜSTER, C.; WOLF, G. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in obesity-related renal diseases. **Semin Nephrol.**, v.33, n.1, p.44-53, 2013.

RUXTON, C. H. *et al.* The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **J Hum Nutr Diet.**, v.17, n.5, p.449-459, 2004.

SABRY, A. *et al.* Colchicine vs. omega-3 fatty acids for prevention of chronic cyclosporine nephrotoxicity in Sprague Dawley rats: an experimental animal model. **Arch Med Res.**, v.37, n.8, p.933-940, 2006.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine**, v.3, n.1, p.20-31, 2007.

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. **Clin Exp Allergy**, v.38, n.9, p.1432-1450, 2008.

SAM, R. *et al.* Lipoprotein glomerulopathy: a new apolipoprotein E mutation with enhanced glomerular binding. **Am J Kidney Dis.**, v.47, n.3, p.539-548, 2006.

SANTANA, R. C.; PERRECHIL, F. A.; CUNHA, R. L. High- and low-energy emulsifications for food applications: a focus on process parameters. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 2, p. 107–122, 2013.

- SANTOS, D. S. *et al.* Oral delivery of fish oil in oil-in-water nanoemulsion: development, colloidal stability and modulatory effect on in vivo inflammatory induction in mice. **Biomed Pharmacother**, v.133, 110980, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110980.
- SEO, S. H.; FANG, F.; KANG, I. Ginger (*Zingiber officinale*) Attenuates Obesity and Adipose Tissue Remodeling in High-Fat Diet-Fed C57BL/6 Mice. **Int J Environ Res Public Health**, v.18, n.2, p.631, 2021. DOI:10.3390/ijerph18020631
- SHANKLAND, S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. **Kidney Int.**, v.69, n.12, p.2131-2147, 2006.
- SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v.132, n.6, p.2169-2180, 2007.
- SHUKLA, V. K.; PERKINS, E. G. The presence of oxidative polymeric materials in encapsulated fish oils. **Lipids**, v.26, n.1, p.23-26, 1991.
- STANHOPE, K. L. *et al.* Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **J Clin Invest.**, v.119, n.5, p.1322-1334, 2009.
- SUN, Y. *et al.* High-fat diet promotes renal injury by inducing oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Cell Death Dis.**, v.11, n.10, 914, 2020. DOI:10.1038/s41419-020-03122-4
- SURWIT, R. S. *et al.* Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. **Diabetes**, v.37, n.9, p.1163-1167, 1988.
- TALUKDAR, S. *et al.* Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. **Nat Med.**, v.18, n.9, p.1407-1412, 2012.
- TANEDA, S. *et al.* Eicosapentaenoic acid restores diabetic tubular injury through regulating oxidative stress and mitochondrial apoptosis. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v.299, n.6, p.1451-1461, 2010.
- THAKKAR, R. R. *et al.* Docosahexaenoic acid reverses cyclosporin A-induced changes in membrane structure and function. **Biochim Biophys Acta**, v.1474, n.2, p.183-195, 2000.
- TISHINSKY, J. M. *et al.* Fish oil prevents high-saturated fat diet-induced impairments in adiponectin and insulin response in rodent soleus muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v.302, n.5, p.598-605, 2012.
- TOCK, L. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease decrease in obese adolescents after multidisciplinary therapy. **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, v.18, n.12, p.1241-1245, 2006.
- WALKER, C. G.; JEBB, S. A.; CALDER, P. C. Stearidonic acid as a supplemental source of ω -3 polyunsaturated fatty acids to enhance status for improved human health. **Nutrition**, v.29, n.2, p.363-369, 2013.

WALKER, R.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. **Food Funct.**, v.6, n.1, 42-55, 2015.

WANG, Q.; WU, H. T. Cells in Adipose Tissue: Critical Players in Immunometabolism. **Front Immunol.**, v.9, 2509, 2018. DOI:10.3389/fimmu.2018.02509.

WANG, T.; WU, Q.; ZHAO, T. Preventive Effects of Kaempferol on High-Fat Diet-Induced Obesity Complications in C57BL/6 Mice. **Biomed Res Int.**, v.2020, 4532482, 2020. DOI:10.1155/2020/4532482

WEI, P. *et al.* Glomerular structural and functional changes in a high-fat diet mouse model of early-stage Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v.47, n.9, p.1541-1549, 2004.

WEINBERG, J. M. Lipotoxicity. **Kidney Int.**, v.70, n.9, p.1560-1566, 2006.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **J Clin Invest.**, v.112, n.12, p.1785-1788, 2003.

WEST, D. B. *et al.* Dietary obesity in nine inbred mouse strains. **Am J Physiol.**, v.262, n. 6, p.1025-1032, 1992.

WEST, D. B.; YORK B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **Am J Clin Nutr.**, v.67, n.3, p.505-512, 1998.

WHITE, P. A. S. *et al.* Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arq Bras Endocrinol e Metabol.**, v. 57, n. 5, p. 339–345, 2013.

WICKMAN, C.; KRAMER, H. Obesity and kidney disease: potential mechanisms. **Semin Nephrol.**, v.33, n.1, p.14-22, 2013.

WIGGINS, J. E. *et al.* Podocyte hypertrophy, "adaptation," and "decompensation" associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. **J Am Soc Nephrol.**, v.16, n.10, p.2953-2966, 2005.

WINZELL, M. S.; AHRÉN, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes**, v.53, n. 3, p. 215-219, 2004.

WU, H. *et al.* T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. **Circulation**, v.115. n.8, p.1029-1038, 2007.

YAMAMOTO, T. *et al.* Eicosapentaenoic acid attenuates renal lipotoxicity by restoring autophagic flux. **Autophagy**, v.17, n. 7, p.1700-1713, 2021.

YAMAMOTO, T. *et al.* High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. **J Am Soc Nephrol.**, v.28, n.5, p.1534-1551, 2017

YANG, P. *et al.* Inflammatory stress promotes the development of obesity-related chronic kidney disease via CD36 in mice. **J Lipid Res.**, v.58, n.7, p.1417-1427, 2017. doi:10.1194/jlr.M076216.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev.**, v.74, n.1, p.139-162, 1994.

ZANETTI, M. *et al.* Omega 3 Polyunsaturated Fatty Acids Improve Endothelial Dysfunction in Chronic Renal Failure: Role of eNOS Activation and of Oxidative Stress. **Nutrients.**, v.9, n.8, p.1-11, 2017. DOI:10.3390/nu9080895

ZHANG, F. *et al.* Polymer-coated nanoparticles: a universal tool for biolabelling experiments. **Small.**, v.7, n.22, p.3113-3127, 2011.

ZIMET, P.; LIVNEY, Y. D. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 4, p.1120–1126, 2009.

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

ibrag
Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito de ácidos graxos insaturados sobre a doença renal causada pela obesidade", registrada com o nº 031/2018, sob a responsabilidade de Jorge José de Carvalho - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 24/05/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	24/05/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	126
Peso/Idade	18 - 20 g / 4 - 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 24 de Maio de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B – Submissão de artigo científico

FOOD RESEARCH INTERNATIONAL

emEditorial Manager

Role: Author Username: priscila.gomes

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • POLICIES

← Submissions Being Processed for Author

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Results per page 10

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission View Reference Checking Results Send E-mail	FOODRES-D-22-04686	Capybara oil improves renal pathophysiology and inflammation in obese mice	Jul 21, 2022	Aug 07, 2022	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Results per page 10

ANEXO C – Depósito de patente



12/11/2021 870210104808



29409161937641413

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 022799 0

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): NANOEMULSÕES DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS PARA O TRATAMENTO DAS DOENÇAS ASSOCIADAS À OBESIDADE, USO E PROCESSO DE OBTENÇÃO**Resumo:** A presente invenção se refere a uma nanoemulsão do óleo de capivara de liberação controlada, com alto teor de ômega-3 e maiores estabilidade e biodisponibilidade de fármacos e ao uso para produção de medicamentos para prevenção e tratamento de doenças associadas à obesidade, como doença renal crônica e esteatose hepática não alcoólica. A presente invenção ainda se refere ao processo de obtenção da referida composição farmacêutica.**Figura a publicar:** 0**Nome:** PRISCILA GOMES PEREIRA**CPF:** 14182818750**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins**Endereço:** RUA AROAZES, 615, APTº 605**Cidade:** Rio de Janeiro**Estado:** RJ**CEP:** 22775-060**País:** BRASIL**Telefone:** (21) 999 286788**Fax:****Email:** priscila_gp@hotmail.com