

Luiza Kuhnen Teixeira

**INGESTÃO DE ÓLEO DE PEIXE E ALTERAÇÕES EM  
PARÂMETROS IMUNITÁRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO  
EM RATOS TRATADOS COM DEXAMETASONA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Nutrição, linha de pesquisa Estudo Dietético e Bioquímico relacionado com o estado nutricional, sob a orientação do Professor Dr. Everson Araújo Nunes.

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Teixeira , Luiza Kuhnen

Ingestão de óleo de peixe e alterações em parâmetros imunitários e de estresse oxidativo em ratos tratados com dexametasona / Luiza Kuhnen Teixeira ; orientador, Everson Araújo Nunes - Florianópolis, SC, 2015.  
92 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Inclui referências

1. Nutrição. 2. Óleo de peixe. 3. Dexametasona. 4. Estresse oxidativo. 5. Sistema imunitário. I. Nunes, Everson Araújo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.





## AGRADECIMENTOS

E lá se foram dois anos de aprendizados, trabalho, cansaço, alegrias e alguns momentos desesperados! O primeiro agradecimento é direcionado ao meu orientador o Professor Dr. Everson, que em meio a tantas atribuições me aceitou como orientanda em meados do curso, confiando na minha dedicação e força de vontade para compensar o tempo “perdido”. Obrigada por ser meu exemplo de inteligência, dedicação, disposição e bondade; obrigada por não perder a paciência nos momentos que não atendi às suas expectativas, e ainda assim continuar sendo um ótimo líder. Você será sempre um grande modelo de profissional para mim.

Agradeço à minha amiga Dra. Brunna Boaventura, que me guiou com muito carinho nas situações em que me encontrei perdida nesse período, à minha família que amo tanto: Edson (pai), Luciane (mãe), Lucas (mano), Fê (mana), os quais não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Sou grata à incrível paciência, amor e parceira providos pelo meu namorado Glauco, aos ensinamentos e diversão dos meus colegas de LIDoC (Carolina, Thayz, Henver, Pri, Cris, Kátia e Paola), em especial à amizade da Caroline, e à doutoranda Amanda, que muito se empenhou na realização dessa pesquisa, tenha certeza que sou extremamente grata. Por fim, agradeço à minha melhor amiga Simone, muito presente nesse período, e aos meus amados avós, vó Zélia, vó Narciso, vó Edna, e vó Edson (*in memoriam*) sempre me admirando e me apoiando nessa caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição agradeço pelos ensinamentos, e em conjunto ao mesmo agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela provisão de sua estrutura, suporte financeiro e, enfim, por possibilitar que essa pesquisa fosse realizada. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma maneira participaram da realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.



## RESUMO

A dexametasona (Dex) é um fármaco glicocorticoide utilizado na prática clínica devido aos efeitos imunossupressores. Entretanto, em altas doses pode aumentar a suscetibilidade a infecções oportunistas e o estresse oxidativo. Aos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI n-3) presentes no óleo de peixe (Op), tem sido atribuído efeitos anti-inflamatórios e imunorreguladores, porém quando usado como suplemento pode, potencialmente, incrementar o estresse oxidativo. Os efeitos da suplementação de Op sobre a imunossupressão e possível incremento do estresse oxidativo mediado via Dex foram investigados. Ratos machos adultos foram divididos em 4 grupos: controle (CTL), Óleo de peixe (OP), Dexametasona (DEX), e Dexametasona e óleo de peixe (DEXOP). CTL e OP receberam salina intraperitoneal (i.p), e DEX e DEXOP receberam 0,5 mg/kg de Dex (i.p.). DEX e CTL receberam 1 g/kg de óleo mineral, e OP e DEXOP receberam 1 g/kg de Op, ambos via gavagem, durante 15 dias. Foram analisados o peso de órgãos linfoides, a contagem de leucócitos, a atividade celular e fagocitária de monócitos e neutrófilos no plasma, as concentrações de albumina, proteína C-reativa (PCR) e atividade das enzimas Lactato desidrogenase (LDH) e Creatinocinase (CK) no soro, bem como a concentração de hidroperóxidos lipídicos e proteínas carboniladas no plasma. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, ou mediana e intervalo interquartil para distribuições assimétricas. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA e *pos hoc* de Tukey, ou Kruskal-Wallis e *pos hoc* de Dunn considerando  $p < 0,05$ . Os resultados mostram que Op promoveu o aumento na atividade fagocitária suprimida pela Dex (DEX=49,6 [47,7-51,5] e DEXOP=80,0 [61,0-90,4] unidades arbitrárias), assemelhando-se ao encontrado nos grupos OP e CTL. Ainda, observou-se tendência de redução na contagem de leucócitos (DEX=8,6 [5,8-11,0] e DEXOP =7,5 [5,9-11,0]  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ), linfócitos (DEX=3,2 [2,2-3,4] e DEXOP =1,8 [1,4-3,5]  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ), monócitos (DEX=2,0 [1,2-3,6] e DEXOP=1,3 [1,0-2,8]  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) e de aumento na contagem de granulócitos (DEX=3,4 [2,0-4,8] e DEXOP=4,2 [2,6-5,5]  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ). O Op não promoveu alterações nas concentrações de albumina, PCR, peróxidos lipídicos, proteínas carboniladas, e na atividade da LDH e CK, nos ratos tratados com Dex. Diante do exposto conclui-se que a suplementação de Op no binômio dose-tempo utilizado não suprime a função imunitária, e pelo contrário, promove normalização da função fagocitária, suprimida pela Dex, sem alterar o estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** dexametasona, óleo de peixe, estresse oxidativo, imunossupressão.

## ABSTRACT

Dexamethasone (Dex) is a synthetic glucocorticoid applied in clinical practice due to its immunosuppressive properties. However, in high doses, it can increase susceptibility to opportunistic infections and oxidative stress. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) present in fish oil (Fo) have anti-inflammatory and immunoregulatory properties. On the other hand, Fo supplementation might increase oxidative stress. We investigated the effects of Fo supplementation on immune suppression and the potential increase in the oxidative stress mediated by Dex. Adult male rats were divided in 4 groups: Control (CG), Fish Oil (FOG), Dex (DG) and Dex+Fo (DFOG). CG and FOG received saline (i.p.). DG and DFOG received 0.5 mg/kg Dex (i.p.). Non-supplemented groups received 1 g/kg of mineral oil and supplemented groups received 1 g/kg Fo by gavage, for 15 days. We evaluated the white blood cells count, lymphoid organs weights, monocytes and neutrophils activity and phagocytic function, albumin and C-reactive protein (CRP) concentrations, lactate dehydrogenase and creatine kinase activity in serum, and plasmatic lipid hydroperoxyde and protein carbonyl concentrations. Data were expressed as mean±standard error mean or median and interquartile range, and analyzed by ANOVA test followed by Tukey *post hoc* or Kruskal Wallis test followed by Dunn *post hoc* at a significance level of  $p<0.05$ . Comparing DG with DFOG, Fo promoted an increase in monocyte and neutrophils phagocytic functionality suppressed by Dex (DG=49.6 [47.7-51.5] vs. DFOG=80.0 [61.0-90.4] arbitrary units), resembling that one found in CG and FOG. DFOG showed a tendency of decrease in lymphocytes (DG=3.2 [2.2-3.4] vs. DFOG=1.8 [1.4-3.5]  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) and monocytes (DG=2.0 [1.2-3.6] vs. DFOG=1.3 [1.0-2.8]  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ), and an increase in granulocyte count (DG=3.4 [2.0-4.8] vs. DFOG=4.2 [2.6-5.5]  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ). Fo did not promote alterations in albumin, CRP, lipid hydroperoxyde and protein carbonyl concentrations, and in LDH and CK activities, in the rats treated with Dex. Fo supplementation did not suppress the immune function, but instead, improved phagocytic function suppressed by Dex, without alterations in oxidative stress, according to the dose-time binomial applied.

**Key words:** dexamethasone, fish oil, oxidative stress, immunosuppression.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de peroxidação lipídica.....	39
Figura 2: Período de realização do estudo.....	48
Figura 3: Informação nutricional das cápsulas de óleo de peixe.....	48
Figura 4: Gráficos de citometria de fluxo representativos dos neutrófilos e monócitos de um rato do grupo CTL.....	51
Figura 5: Evolução do peso corporal (g) de ratos controle (CTL), tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante o período de 15 dias.....	57
Figura 6: Atividade celular mediada pela incorporação do vermelho neutro (A) e função fagocitária de neutrófilos e monócitos conforme a intensidade da fluorescência pela captação do vermelho neutro estimulada por zimozan (B), em ratos CTL, tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias (unidades arbitrárias).....	61
Figura 7: Concentração de hidroperóxidos lipídicos no plasma de ratos CTL, tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante o período de 15 dias (mmol/mg de proteínas).....	63
Figura 8: Concentração de proteínas carboniladas no plasma de ratos CTL, tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias (nmol/mg de proteínas).....	63



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos do tratamento com dexametasona sobre parâmetros imunitários e de estresse oxidativo.....	30
Tabela 2: Tipos de tratamento e amostra por grupo experimental.....	47
Tabela 3: Composição do Óleo de peixe Phytomare® em ácidos graxos.....	49
Tabela 4: Avaliação do peso corpóreo, parâmetros imunitários, marcadores de estresse oxidativo e de lesão celular de ratos controle (CTL) e tratados com 0,5 mg/kg de Dex (DEX) durante 15 dias.....	56
Tabela 5: Consumo de ração (g/kg p.c.) e de água (ml/kg p.c.) de ratos controle (CTL), tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias.....	58
Tabela 6: Peso relativo do timo e fígado de ratos controle (CTL), tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias (mg de tecido/kg de p.c.).	59
Tabela 7: Contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos de ratos controle (CTL), tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op durante 15 dias ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ).....	60
Tabela 8: Concentrações de PCR (mg/L) e albumina (g/L) e atividade enzimática da LDH e CK (U/L) nos ratos CTL, tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias.....	62



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AA – Ácido araquidônico
- AGPI – Ácido graxo poli-insaturado
- CTL – Grupo controle
- CK - Creatinocinase
- Dex – Dexametasona
- DEX – Grupo dexametasona
- DEXOP – Grupo dexametasona e óleo de peixe
- DHA – Ácido graxo docosaexaenoico
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- ELISA – Imunoensaio enzimático
- EPA – Ácido graxo eicosapentaenoico
- ER – Espécies reativas
- ERN – Espécies reativas de nitrogênio
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- IFN-gama- Intérferon gama
- IL – Interleucina
- LDH – Lactato desidrogenase
- n-3 – Ômega 3
- n-6 – Ômega 6
- NK – Células Natural Killer
- NF- $\kappa$ B – Fator nuclear kappa B
- Op – Óleo de peixe
- OP – Grupo óleo de peixe
- PCR – Proteína C-reativa
- PG – Prostaglandina
- PPAR $\gamma$  - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gamma
- TPP - Trifenilfosfina
- TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral-alpha



## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	27
2.1.Objetivo geral.....	27
2.2.Objetivos específicos.....	27
<b>3.REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	29
3.1.Dexametasona.....	29
3.2.Sistema imunitário.....	31
3.2.1.Marcadores da resposta imunitária.....	32
3.2.2.Inflamação e marcadores da resposta inflamatória.....	34
3.2.3.Estresse oxidativo.....	36
3.3.1.Marcadores de estresse oxidativo.....	38
3.3.2.Marcadores de lesão celular.....	40
3.4.Óleo de peixe e ácidos graxos poli-insaturados.....	40
3.4.1.Óleo de peixe e marcadores da resposta imunitária.....	41
3.4.2.Óleo de peixe, estresse oxidativo e lesão celular.....	43
3.5.Dexametasona e óleo de peixe.....	44
3.6.Hipótese.....	45
3.6.1.Hipótese nula.....	45
3.6.2.Hipótese alternativa.....	45
<b>4.METODOLOGIA</b> .....	46
4.1.Caracterização do estudo.....	46
4.2.Animais de experimentação e aspectos éticos.....	46
4.3.Desenho do estudo e grupos de tratamento.....	46
4.4.Determinação da ingestão alimentar.....	49
4.5.Determinação da ingestão hídrica.....	49
4.6.Determinação do peso corporal.....	50
4.7.Coleta do material biológico.....	50
4.8.Análises biológicas.....	50
4.8.1.Contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos.....	50
4.8.2.Determinação da funcionalidade celular e atividade fagocitária celular de monócitos e neutrófilos sanguíneos .....	50
4.8.3.Quantificação da Proteína C-Reativa, albumina, determinação da atividade da LDH e CK no soro.....	52
4.8.4.Determinação da concentração de hidroperóxidos lipídicos no plasma.....	52
4.8.5.Dosagem da concentração de proteínas carboniladas no plasma.....	53
4.9.Análise Estatística.....	54
<b>5.RESULTADOS</b> .....	55

5.1.Caracterização do modelo experimental.....	55
5.2.Evolução do peso corporal.....	57
5.3.Consumo de ração e ingestão hídrica.....	57
5.4.Peso do timo, fígado e baço.....	58
5.5.Contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos.....	59
5.6.Determinação da funcionalidade celular e atividade fagocitária celular de monócitos e neutrófilos sanguíneos.....	60
5.7.Determinação da concentração de proteína C-Reativa e albumina, e da atividade da LDH e CK no soro.....	61
5.8.Determinação da concentração plasmática de hidroperóxidos lipídicos.....	62
5.9.Determinação da concentração plasmática de proteínas carboniladas.....	63
<b>6.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
<b>APÊNDICE A: Nota à imprensa.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO A: Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC.....</b>	<b>92</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Dex é um fármaco de ação glicocorticoide, comumente utilizado na prática clínica, sendo indicado para diversos fins terapêuticos, como no tratamento das manifestações clínicas da artrite reumatoide e de desordens inflamatórias, devido aos efeitos imunossupressores e inibitórios da inflamação (CZOCK et al., 2005; SCHÄCKE, DOCKE & ASADULLAH, 2002).

Embora a supressão imunitária e inflamatória seja um dos efeitos desejados no uso do fármaco, quando utilizado em altas doses e e/ou cronicamente pode suprimir o sistema imunitário de modo a aumentar a suscetibilidade a infecções oportunistas (SCHÄCKE, DOCKE & ASADULLAH, 2002), além de aumentar a expressão de espécies reativas de oxigênio (ERO) e reduzir a capacidade antioxidante, podendo levar ao incremento do estresse oxidativo (NISHIGORI et al., 1986; LINGAIAH, THAMARAISELVAN & PERIYASAMY, 2012). O estresse oxidativo cronicamente instalado pode desencadear processos patológicos e contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas (GREEN, BRAND & MURPHY, 2004; PAPA HARALAMBUS GRIENGLING, 2007; HALLIWELL, 2014).

Suplementos alimentares têm sido utilizados como adjuvantes em terapias de desordens inflamatórias, como nas doenças auto-imunes. Ao óleo de peixe, devido seu conteúdo em ácidos graxos da série ômega-3, tem-se atribuído propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras (SERHAN, 2006).

Os ácidos graxos ômega-3, ao serem incorporados à membrana celular promovem o aumento da susceptibilidade ao ataque de espécies reativas de oxigênio devido à presença de duplas ligações em suas cadeias hidrocarbônicas (NORBERG & ARNER, 2001; YOSHIDA, 2003). Alguns estudos realizados com ratos suplementados com óleo de peixe, obtiveram como resultado aumento na susceptibilidade da membrana de eritrócitos à peroxidação lipídica (MIRET, SAÍZ & MITJAVILA et al., 2003), redução nas concentrações plasmáticas e incremento da necessidade nutricional de vitamina E (MCGUIRE et al., 1997; IBRAHIM et al. 1997; KIKUWAGA et al., 2003), enquanto outros observaram incremento na síntese de espécies reativas de oxigênio por macrófagos isolados do peritônio (MORENO et al., 2003).

Considerando que a dexametasona é um fármaco que apresenta ação imunossupressora, que em longo prazo expõe o organismo à suscetibilidade aumentada a infecções oportunistas e de incremento em parâmetros de estresse oxidativo, avaliaremos os efeitos da

administração do óleo de peixe sobre o tratamento com Dex em ratos, uma vez que tem sido relatada na literatura uma possível regulação negativa do sistema imunitário e incremento dos parâmetros de estresse oxidativo. Adicionalmente, poderemos contribuir com o conhecimento existente para futuras investigações sobre a utilização do óleo de peixe quando associado a fármacos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre os parâmetros imunitários e de estresse oxidativo em ratos tratados com dexametasona.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinação do peso corpóreo;
- Determinação do peso dos seguintes órgãos e tecidos (fígado, timo e baço);
- Verificação da contagem e proporções de leucócitos totais e subtipos;
- Determinação da atividade celular e fagocitária de neutrófilos e monócitos;
- Determinação das concentrações albumina, PCR e atividade das enzimas LDH e CK no soro;
- Determinação da lipoperoxidação no plasma;
- Determinação das proteínas carboniladas no plasma;



### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Dexametasona

A dexametasona (Dex) é um dos glicocorticoides sintéticos mais utilizados na prática clínica, e apresenta afinidade 50 vezes maior aos receptores de glicocorticoides em relação ao cortisol (SCHÄCKE, DOCKE & ASADULLAH, 2002). Os fármacos glicocorticoides são potentes agentes anti-inflamatórios e imunossupressores, utilizados principalmente no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias, transplantes de órgãos e tecidos (DE BOSSCHER, BECK & HAEGERMAN, 2010) e no manejo clínico do câncer (MARANZANO et al., 2005). A Dex é o fármaco mais eficaz para o tratamento das manifestações clínicas da artrite reumatoide (SCHÄCKE, DOCKE & ASADULLAH, 2002).

O uso dos fármacos glicocorticoides é limitado devido aos seus efeitos colaterais como a adiposidade central, dislipidemia, redução da massa muscular, osteoporose, atraso no crescimento infantil, problemas comportamentais, resistência insulínica, intolerância à glicose, diabetes tipo 2 e supressão imunitária (SCHÄCKE, DOCKE & ASADULLAH, 2002; VAN RAALTE et al., 2009).

As medicações glicocorticoides têm seu efeito biológico na inflamação por meio de mecanismos como a supressão de genes ativados durante a inflamação crônica, invertendo a acetilação de histonas de genes inflamatórios ativados por intermédio da ligação com receptores de glicocorticoides. Em concentrações mais elevadas, os glicocorticoides ativam a transcrição de genes anti-inflamatórios e de diversos genes ligados aos seus efeitos colaterais (BARNES, 2010).

Os efeitos imunossupressores dos glicocorticoides incluem alterações na circulação e migração de leucócitos, inibição da síntese de linfócitos, da função dos monócitos (WINKELSTEIN, 1991) e indução da apoptose de alguns tipos de leucócitos (YOSHIMURA et al., 2001).

Em estudos com seres humanos foi observado que os glicocorticoides inibem a ativação antígeno específica dos linfócitos-T, retardam a maturação de macrófagos e células dendríticas, aumentam o desenvolvimento de células T regulatórias especializadas, e induzem a apoptose de células T (GUYRE, YAEGER & MUNK, 2008). Consequentemente, dentre os efeitos colaterais do uso de glicocorticoides inclui-se o risco aumentado para todos os tipos de infecção, principalmente quando utilizado em altas doses, com

mascaramento dos sintomas (SCHÄCKE, DOCKE & ASADULLAH, 2002).

O uso prolongado de glicocorticoides induz o aumento das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, indicando incremento na síntese de espécies reativas de oxigênio, e reduz a capacidade antioxidante pela redução na expressão de algumas enzimas antioxidantes (NISHIGORI et al., 1986; LINGAIAH, THAMARAISELVAN & PERIYASAMY, 2012).

As ERO são formadas continuamente de forma controlada em condições fisiológicas, como no processo de fosforilação oxidativa mitocondrial, mas o aumento na sua formação pode ocorrer em condições de estresse oxidativo, levando a lesão de macromoléculas e alterando negativamente a sinalização celular, que podem implicar na patogênese de diversas doenças (RAY, HUANG & TSUJI, 2012).

A tabela 1 elenca alguns estudos relacionados ao efeito da Dex sobre parâmetros imunitários e de estresse oxidativo em ratos.

Tabela 1. Efeitos do tratamento com dexametasona sobre parâmetros imunitários e de estresse oxidativo em ratos.

Referência	Animais	Grupos de tratamento (n)	Dose e período	Resultados
<b>OHKARU et al., 2010</b>	Ratos adultos e machos Sprague Dawley	DEX (9) Controle (8)	1 mg/kg injetável por 10 dias	Redução na contagem e leucócitos (40%) e linfócitos (90%) (p<0,05)
<b>AMAR et al., 2013</b>	Ratas adultas Wistar	DEX (6) Controle (6)	60 mcg/kg via oral por 30 dias	Redução na contagem de leucócitos no grupo DEX (p<0,05)
<b>CONOLLY et al., 1988</b>	Ratos com artrite adjuvante (AA)	DEX (30) Controle (10)	0,02, 0,1 e 0,5 mg/kg injetável por 15 dias	Redução de 60% IL-1 baixo, 33%, 77% e 95% PCR e aumento 44%, 128% e 239% albumina
<b>MENDEZ-ARMENTA et al., 2003</b>	Ratos Wistar de ambos os sexos com 13 dias	DEX (8) Controle (8)	2 mg/kg injetável por 5 dias	Aumento da lipoperoxidação no córtex, cerebelo e corpo estriado (p<0,05)
<b>LINGAIAH et al., 2012.</b>	Ratos Wistar machos	DEX (6) Controle (6)	0,7 mg/kg injetável por 9 dias	Aumento na lipoperoxidação hepática (p<0,0001)

### 3.2. Sistema Imunitário

O sistema imunitário é responsável pela proteção do organismo contra substâncias estranhas, incluindo microrganismos, proteínas e polissacarídeos, e ao mesmo tempo por evitar respostas que produzam danos excessivos aos próprios tecidos ou que possam eliminar microrganismos comensais benéficos (CHAPLIN, 2010). Compõem o sistema imunitário as barreiras físicas, como a pele, mucosas, cílios, químicas como o pH gástrico, saliva e outras secreções, a imunidade inata e a imunidade adaptativa (TURVEY & BROIDE, 2010).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro, e reage a uma variedade de substâncias estranhas. Os mecanismos de defesa da imunidade inata estão constitutivamente presentes e prontos para serem mobilizados quando necessário. Ademais, a imunidade inata desempenha um papel crucial na ativação da resposta imunitária adaptativa subsequente (MAYER, 2011).

Dentre os principais componentes celulares do sistema imunitário inato estão os macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células *Natural Killer* (NK), e Células T NK. Da imunidade inata também participam componentes humorais como proteínas do sistema complemento, peptídeos antimicrobianos, proteína C reativa, defensinas, entre outros, envolvidos na detecção do organismo estranho e na resolução da infecção (TURVEY & BROIDE, 2010).

O sistema imunitário adaptativo se caracteriza por respostas direcionadas a determinados organismos estranhos, e dependem de receptores específicos. Após contato inicial com o patógeno as células expressando receptores específicos podem persistir no hospedeiro ao longo da vida, caracterizando uma memória imunológica e a capacidade de responder rapidamente no caso de uma nova exposição ao mesmo organismo patogênico. Os componentes celulares da imunidade adaptativa são os linfócitos T, que são as células efetoras da resposta imunitária celular, e os linfócitos B, produtores de imunoglobulinas (BONILLA & OETTGEN, 2010).

O objetivo do sistema imunitário é proteger o hospedeiro contra a invasão de patógenos e outros desafios ambientais sem causar danos teciduais desnecessários. A regulação anormal dos mecanismos efetores pode levar ao dano tecidual agudo ou crônico, como no caso do processo inflamatório exacerbado em reações atópicas e distúrbios autoimunes (CHAPLIN, 2010).

Os glicocorticoides são amplamente utilizados, devido às ações imunossupressoras e anti-inflamatórias, e as doses terapêuticas destes

fármacos suprimem mecanismos de defesa que poderiam danificar o organismo, como no caso das doenças autoimunes (GUYRE, YAEGER & MUNK, 2008). Por outro lado, o uso prolongado de glicocorticoides expõe o organismo a infecções oportunistas (SCHÄCKE, DOCKE & ASADULLAH, 2002).

### 3.2.1 Marcadores da resposta imunitária

Os leucócitos são todas as células que compõem o sistema imunitário, e provêm de células hematopoéticas pluripotentes que se diferenciam em progenitor mieloide e progenitor linfoide. O progenitor linfoide pode se diferenciar em quatro populações de linfócitos maduros: linfócitos B, linfócitos T, células *Natural Killer* (NK), e células T *Natural Killer*; os leucócitos provenientes do progenitor mieloide são os neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, e mastócitos (CHAPLIN, 2010).

Os linfócitos compreendem uma classe de células do sistema imunitário adaptativo, divididos em dois grandes grupos: os linfócitos T e os linfócitos B, ambos são produzidos na medula óssea, e diferem quanto ao local de maturação. Enquanto as células B maturam na própria medula para as células T esse processo ocorre no timo (SOMPAYRAC, 2012).

As células B têm a capacidade de reconhecer um antígeno diretamente, e produzem imunoglobulinas que reconhecem as moléculas estranhas. Já as células T reconhecem antígenos apresentados por outras células imunitárias, e têm a função de eliminar células infectadas por patógenos, produzir citocinas que sinalizam para o aumento das respostas de células B e T, bem como ativar fagócitos mononucleares; ainda, as células T regulam as respostas imunitárias, limitando o dano tecidual incorridos de respostas auto reativas ou de um processo inflamatório exacerbado (SOMPAYRAC, 2012; BONILLA & OETTGEN, 2010).

As células denominadas granulócitos pertencem à linhagem mieloide, têm função de produzir moléculas imunologicamente ativas, e caracterizam-se por se acumularem em situações patológicas específicas. São considerados granulócitos os neutrófilos, eosinófilos, e basófilos (CHAPLIN, 2010).

Dentre as funções dos granulócitos, cada tipo celular possui suas particularidades. Os neutrófilos produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio que são citotóxicas para bactérias patogênicas; os eosinófilos são reconhecidos por possuírem grânulos

citoplasmáticos com moléculas tóxicas e enzimas contra helmintos e outros parasitas. Os basófilos e mastócitos iniciam as respostas de hipersensibilidade e a resposta do hospedeiro a presença de helmintos, liberando histamina e outros mediadores inflamatórios (CHAPLIN, 2010).

Os monócitos sanguíneos dão origem aos fagócitos mononucleares nos tecidos, os quais realizam fagocitose, eliminando microrganismos, são eficientes em recrutar outras células mieloides através da liberação de citocinas quimiotáticas, e em apresentar antígenos às células T da imunidade adaptativa (BEUTLER, 2004).

Os fagócitos monócitos, macrófagos e neutrófilos são cruciais na defesa inata do organismo contra infecções, exercem função importante na iniciação da imunidade adaptativa, e no reconhecimento, internalização e eliminação da maioria dos patógenos extracelulares. Suas funções incluem fagocitose, digestão intracelular e extracelular de antígenos, liberação de espécies reativas de oxigênio e quimiotaxia (BASOE, 2002; SOKOLOVSKA, BECKER & STUART, 2012). A redução das funções dos fagócitos predispõe o organismo a infecções locais ou sistêmicas (SALIH, HUSFELD & ADAM, 2000).

A atividade fagocitária pode ser mensurada a partir da captação de partículas inertes, metodologia que tem fornecido a maior parte do conhecimento existente sobre a formação de fagossomos. As partículas inertes se tornam fluorescentes na utilização de um fluorocromo, que podem ser mensuradas por métodos como microscopia, leitores de placas e citometria de fluxo, a qual apresenta vantagem sobre os demais devido ao menor tempo de aplicação, bem como a capacidade de analisar um número superior de eventos fagocitários (NUSSE, 2011). A funcionalidade dos fagócitos também é um marcador imunitário, que pode ser testado através da difusão passiva de um fluorocromo como o vermelho neutro, o qual se internaliza nos lisossomos das células quando estas estão viáveis e com o p.H. adequado (WINCKLER, 1974; REPETO, PESO & ZURITA, 2008). A administração de Dex em ratos reduz a função fagocitária de macrófagos peritoneais (GRASSO, KLEIN & BENJAMIN, 1981; BECKER & GRASSO, 1985), macrófagos presentes nos alvéolos pulmonares (NAKAMURA, MURAI & OGAWA, 1996), e em macrófagos provenientes do baço (MLAMBO & SIGOLA, 2003).

A contagem de leucócitos e neutrófilos é um marcador sanguíneo da capacidade imunitária, comumente utilizado na prática clínica. Entretanto, o número de leucócitos também pode alterar em resposta a situações não patológicas como estresse emocional ou físico.

Os glicocorticoides administrados exogenamente promovem redução na contagem de linfócitos, promovendo ação de supressão do sistema imunitário (NAGATOMI, 2006).

A administração aguda de Dex em ratos promove redução na contagem de leucócitos e alteração na distribuição dos tipos de células, enquanto a administração crônica leva a diminuição significativa do número de leucócitos, linfócitos, basófilos, eosinófilos e monócitos, e pode levar ao incremento no número de neutrófilos (OHKARU, 2010).

### **3.2.2 Inflamação e marcadores da resposta inflamatória**

A inflamação consiste em um mecanismo de defesa benéfico para o hospedeiro, em resposta a um estímulo externo ou injúria celular que leva a ativação de mediadores inflamatórios, finalizando com a restauração da estrutura e função do tecido. Apesar dos benefícios da resposta inflamatória, a inflamação prolongada pode ser prejudicial ao hospedeiro, contribuindo para a patogênese de muitas doenças (PASCUAL & GLASS, 2006).

A resposta inflamatória é estimulada por uma rede complexa de mediadores e de vias de sinalização. As citocinas que regulam a resposta inflamatória incluem interleucinas, responsáveis pela comunicação entre leucócitos, quimiocinas que promovem a quimiotaxia, e os interferons que possuem efeitos antivirais. Além disso, essas moléculas estão envolvidas tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa, desempenhando um papel fisiológico no tecido linfoide, nas alterações biológicas ocorridas ao longo da vida, e na reparação dos tecidos (WONG & FISH, 2003; RAMAN, SOBOLIK-DELMIRE & RICHMOND, 2011). A expressão cronicamente alterada de citocinas está relacionada à ocorrência de patologias relacionadas com inflamação crônica, ocorrência de tumores, e autoimunidade (KLEINER et al., 2013).

O processo inflamatório caracteriza-se por sinais clínicos como vermelhidão, calor, dor e edema, decorrentes do aumento da vascularização local e recrutamento celular. Neste processo, leucócitos são recrutados para o sítio de inflamação, e são induzidos a produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), e interleucina 8 (IL-8), que promovem estímulos para a síntese de mediadores inflamatórios, como os eicosanoides (CALDER, 2005)

Na ausência de processo inflamatório, ratos adultos podem expressar concentrações séricas de IL-1 $\beta$  entre 1,4 ( $\pm$ 0,2) e 50,1 ( $\pm$ 5,2)

pg/mL, IL-10 entre 3,7 ( $\pm 0,5$ ) e 141,7 ( $\pm 29,5$ ) pg/mL, de IL-6 entre 5,3 ( $\pm 0,7$ ) pg/mL e 37,5 ( $\pm 15$ ) pg/mL, e de TNF- $\alpha$  entre 0,37 ( $\pm 1,2$ ) e 32,9 ( $\pm 9,9$ ) pg/mL (GUL, YASIM & ARAL, 2010; WANG et al., 2005; TAKÁCS et al., 1996; GUI et al., 2012).

Em resposta ao aumento circulante de IL-6 e IL-1 durante o processo inflamatório o fígado produz proteína C reativa (PCR), uma proteína de fase aguda não específica, que reduz após a resolução da inflamação (DU CLOS, 2000). A proteína C reativa promove a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, liga-se a antígenos nucleares, ativa o sistema complemento, mascara auto antígenos podendo impedir a autoimunidade, aumenta a fagocitose e liberação de citocinas pró-inflamatórias (MARNELL, MOLD & DU CLOS, 2005). De acordo com Tomazi e colaboradores (2013), concentrações fisiológicas de PCR em ratos saudáveis podem variar entre 0,01 e 0,02 mg/dL.

A albumina é uma proteína de fase aguda negativa, que tende a se apresentar em concentrações séricas reduzidas durante o processo inflamatório, em decorrência do aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (CORRÊA et.al, 2002). De acordo com Don e Kaysen (2004), a inflamação e a desnutrição promovem a redução da concentração de albumina no soro através do decréscimo de sua síntese hepática, enquanto o processo inflamatório isolado está associado ao aumento da taxa de catabolismo e, quando exacerbado, aumenta a transferência da albumina para fora do compartimento vascular. Uma cascata de eventos cíclicos se estabelece em que a inflamação induz a anorexia, reduz a ingestão de energia e a eficácia da utilização da proteína dietética, e aumenta o catabolismo reduzindo as concentrações de albumina. As concentrações fisiológicas de albumina em ratos adultos e machos Wistar podem variar entre 3,0 e 4,0 mg/dL (SANTOS, RAFACHO & BOSQUEIRO, 2007; LUCIANO & MELLO, 1999).

Os glicocorticoides promovem supressão do processo inflamatório principalmente através da regulação da expressão de genes relacionados à inflamação, suprimindo a função de diversas células da imunidade inata e adaptativa. Os efeitos imunossupressores dos glicocorticoides ocorrem através da inibição da expressão de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, síntese de amins bioativas e mediadores lipídicos e mudanças na adesão e permeabilidade vascular (CLARK & BELVISI, 2012).

A administração de glicocorticoides leva a redução da liberação de endotoxinas, diversas citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, a qual regula a síntese de proteína C reativa. A Dex promove a redução

das concentrações de proteína C reativa em diversas condições de exacerbação da resposta inflamatória (FOGEL et. al, 2014; LINDBERG et. al, 2003; VERHOEF et. al, 1999; OTTERNESS et. al, 1991). Santos, Rafacho e Bosqueiro (2007) observaram aumento de 1,3 vezes nas concentrações de albumina no soro de ratos submetidos à administração de 1 mg/kg de dexametasona por 3 e 5 dias consecutivos.

### 3.3. Estresse oxidativo

A geração de espécies reativas (ER) é um processo fisiológico que ocorre de maneira contínua, e estas servem de mediadores para a transferência de elétrons nas reações. O estresse oxidativo se caracteriza pelo desequilíbrio entre compostos com ação oxidante e antioxidante, em que ocorre geração excessiva de ER em detrimento da capacidade de removê-las levando, por conseguinte à oxidação de moléculas, que pode levar a perda das funções biológicas das mesmas, culminando na lesão de células e tecidos (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). Ainda, conforme Jones e colaboradores (2006), as ER desempenham a função fisiológica em diversas vias de sinalização celular, e o assim o estresse oxidativo pode ser definido como uma condição de descontrole na sinalização mediada pelo sistema redox.

As ER são moléculas instáveis geradas em condições fisiológicas e patológicas. Entretanto, em concentrações elevadas podem promover lesão celular através da interação com biomoléculas como DNA, proteínas e lipídeos, podendo desencadear processos patológicos (MCCORD, 2000; PAPA HARALAMBUS GRIENDLING, 2007).

O oxigênio, em situações fisiológicas é reduzido, recebendo quatro elétrons, o que resulta na formação de água ( $H_2O$ ), e de intermediários reativos: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), hidroperóxido ( $HO_2^{\cdot}$ ), superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), e hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (COHEN, 1989). O  $H_2O_2$  tem alto potencial reativo, principalmente por participar da formação de  $OH^{\cdot}$ , uma das espécies reativas mais potentes, capaz de alterar qualquer estrutura que se encontre próxima (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 2012).

O  $O_2^{\cdot-}$  participa das reações de formação de  $OH^{\cdot}$  através da liberação do ferro presente em ferroproteínas para a reação de Fenton ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + OH^{\cdot} + OH^-$ ), e também pode reagir com o radical óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), gerando peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), potencialmente reativo (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004; HALLIWELL, 2012). O ácido desoxirribonucleico (DNA) e os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são os principais alvos do  $OH^{\cdot}$ , que

sofrem peroxidação lipídica nesta reação. O ataque oxidativo ao DNA leva a formação de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, e as alterações promovidas pela oxidação podem levar a mutagênese e carcinogênese (VALKO, 2007).

As membranas celulares são os componentes celulares mais susceptíveis a ação das ER devido ao seu conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, que sofrem lipoperoxidação, alterando as suas estruturas e permeabilidade (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). As alterações na permeabilidade da membrana implicadas pela peroxidação lipídica levam à mudanças nas trocas iônicas, culminando no acúmulo de líquido no interior da célula e por fim na morte da mesma (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Os peróxidos lipídicos podem afetar a função das células através do seu acúmulo na membrana celular interferindo na função dos receptores de membrana, e ainda, os subprodutos da peroxidação lipídica têm propriedades citotóxicas e mutagênicas (SEIFRIED et al., 2007).

O processo de estresse oxidativo, quando crônico, pode ter implicações na etiologia de doenças crônicas como o câncer, doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias intestinais e aterosclerose (GREEN, BRAND & MURPHY, 2004; HALLIWELL, 2012). No sentido de proteger suas moléculas de danos oxidativo ocasionados pelas ER, as células possuem mecanismos de defesa preventivos, reparadores, barreiras físicas e o sistema de defesa antioxidante, responsável pela neutralização ou retardamento da ação das mesmas (RAHAL et al., 2014). Esse sistema de defesa antioxidante engloba os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, de origem endógena ou dietética (BOUAYED & BOHN, 2012; VALKO et al., 2007).

Os antioxidantes podem ter origem endógena como é o caso das superóxido dismutases, catalases, enzimas dependentes da glutatona (glutatona peroxidase, glutatona S-transferase, glutatona redutase), e peroxirredoxinas, e componentes não enzimáticos como a glutatona reduzida e o ácido úrico; podem também ser obtidos através da dieta, como por exemplo a vitamina E, ácido ascórbico e carotenoides (VALKO et al., 2007; BOUAYED & BOHN, 2012). As defesas antioxidantes sintetizadas endogenamente promovem maior proteção contra os danos teciduais mediados pelo estresse oxidativo em relação aos antioxidantes derivados da dieta (HALLIWELL, 2012).

As enzimas antioxidantes catalisam uma cascata de reações para conversão das ERO em moléculas mais estáveis, como H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. Ao lado das enzimas antioxidantes primárias um grande número de enzimas secundárias agem em associação com moléculas antioxidantes

de baixo peso molecular para formar o ciclo de reações redox que provêm os cofatores para as funções das enzimas antioxidantes de ação primária. Os antioxidantes não enzimáticos também funcionam como neutralizadores diretos das ER, e o conjunto dos diferentes tipos de antioxidantes são necessários para sustentar a vida através da manutenção de um delicado balanço redox no meio intracelular, que minimiza os efeitos indesejáveis dos danos celulares causados pelas ER (DURACKOVA, 2010).

Entretanto, assim como as ER podem ter ações fisiológicas e patológicas, as moléculas antioxidantes podem ter ação benéfica através da inibição ou redução da atividade das ER, bem como podem atuar como promotores de doenças, através da neutralização dos efeitos fisiológicos desejados das ER (RAHAL et al., 2014).

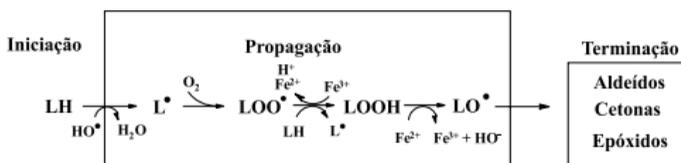
O impacto do estresse oxidativo depende do tipo da molécula pró-oxidante, do local e intensidade de sua produção, e da disponibilidade e atividade dos vários antioxidantes e suas habilidades em reparar os sistemas (DURACKOVA, 2007).

### **3.3.1 Marcadores de estresse oxidativo**

Os marcadores de estresse oxidativo podem ser classificados como moléculas que são modificadas pela interação entre as ER e moléculas do sistema antioxidante que mudam em resposta ao estresse oxidativo. São exemplos de moléculas que podem ser modificadas pelo excesso de ER *in vivo*: lipídios (incluindo fosfolipídios), DNA, proteínas e carboidratos (DALLE-DONE et al., 2005).

São encontradas grandes quantidades de AGPI nas membranas celulares, o que as torna alvos excelentes para o ataque de espécies reativas e, por conseguinte a lipoperoxidação. A Lipoperoxidação inicia com o sequestro de um átomo de hidrogênio do ácido graxo na membrana, que pode ser através de um radical hidroxila, formando um radical de lipídio associado ao carbono, que reage com O<sub>2</sub>, promovendo a síntese de radical peroxil, o qual sequestra um hidrogênio do AGPI da membrana, sintetizando hidropéroxido lipídico (LOOH) (Figura 1) (THOMAS et al., 1990; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Figura 1: Processo de peroxidação lipídica.



Fonte: LOUREIRO, DI MASCIO & MEDEIROS, 2002.

A lipoperoxidação pode ser mensurada por diversos métodos, dentre eles a determinação de hidroperóxidos, realizada através da oxidação do ferro com alaranjado de xilenol (FIRUZI et al., 2006).

As moléculas proteicas também podem sofrer ação nociva das ER, através da oxidação dos aminoácidos, modificando sua função, e tornando-as mais susceptíveis a degradação por enzimas proteolíticas (DALLE-DONNE et al., 2006). Dentre as características da oxidação de proteínas está a introdução de grupos carbonil em resíduos de aminoácidos de proteínas, os quais são passíveis de detecção e quantificação e oxidação catalisada por metais, utilizando o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (LEVINE et al., 1990). A oxidação de proteínas leva a perda da funcionalidade das mesmas, por meio da síntese de proteínas carboniladas e inativação enzimática, alterando a capacidade de transdução de sinal (STADTMAN & LEVINE, 2000). A oxidação de enzimas que participam do fornecimento de energia para as células induz a perda de função celular, e pode ter implicação no aparecimento de doenças (TRETTER & ADAM-VIZI, 2000).

A concentração de proteínas carboniladas é o indicador mais utilizado para identificar a oxidação de proteínas. O acúmulo destas tem sido observada em diversas doenças humanas como a Doença de Alzheimer, diabetes tipo 2, doenças inflamatórias intestinais e artrite (BERLETT & STADTMAN, 1997).

O dano oxidativo leva a perda de funções específicas de proteínas, podendo desencadear importantes consequências biológicas negativas e, a oxidação de enzimas e proteínas estruturais pode contribuir significativamente para a etiologia de diversas doenças (HENSLEY et al., 1995; BUTTERFIELD et al., 1997).

### 3.3.2 Marcadores de lesão celular

Em resposta ao estresse oxidativo ocorre o aumento da atividade extracelular de enzimas que têm ação intracelular como a Lactato Desidrogenase (LDH) e Creatinocinase (CK), devido sua liberação no soro após a perda de integridade das membranas plasmáticas durante a lipoperoxidação dos ácidos graxos (JOVANOVIĆ et al., 2010; VENKATARAMAN et al., 2009; BELL & KHAN, 1999).

Gonzalez-Flecha e colaboradores (1993) verificaram o aumento da atividade da LDH no soro de ratos adultos submetidos à isquemia e reperfusão, indicando que a propagação da cadeia de reações de oxidação iniciada pela liberação de radicais hidroperóxidos culmina em lesão celular.

Em estudo conduzido por Rajashree e Puvanakrishnan (1998), que investigou o efeito da administração de Dex sobre parâmetros de estresse oxidativo, capacidade antioxidante e lesão celular no coração e rins de ratos, foi observado um incremento nas concentrações de LDH e CK no coração após o oitavo dia de tratamento com o fármaco, bem como das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e decréscimo dos níveis de enzimas antioxidantes. Tais resultados sugerem incremento no estresse oxidativo e no processo de lesão celular em resposta a administração do fármaco.

### 3.4. Óleo de peixe e ácidos graxos poli-insaturados

Óleos provenientes da carne de peixes gordurosos ou do fígado de peixes magros, apresentam atividade regulatória no processo inflamatório. Os ácidos graxos ômega-3 eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) que compreendem aproximadamente 30% da composição de ácidos graxos da maioria dos óleos de peixe comercializados (CALDER, 2012). Após serem ingeridos, os ácidos graxos são incorporados em fosfolipídios das membranas celulares, reduzindo a presença do ácido araquidônico (AA) e a produção consequente de eicosanóides derivados do mesmo. Ademais, quando incorporados na membrana celular promovem a síntese de mediadores denominados resolvinas que apresentam potentes propriedades anti-inflamatórias; outros efeitos importantes atribuídos ao EPA e DHA se referem às ações regulatórias sobre fatores de transcrição que regulam a expressão de genes inflamatórios (CALDER, 2009).

Os AGPI compreendem os ácidos carboxílicos compostos por cadeia hidrocarbônica não ramificada, que possuem uma ou mais duplas

ligações (insaturações), sendo classificados como ácidos graxos de cadeia curta (dois a quatro carbonos), média (seis a 10 carbonos) e longa (acima de 12 carbonos) (CURI, 2000).

As famílias de AGPI de maior relevância são os ácidos graxos ômega 3 (n-3) e ômega 6 (n-6), sendo a numeração referente à posição da primeira dupla ligação a partir do carbono ômega no terminal metila da cadeia hidrocarbônica (CALDER, 2005).

O ácido araquidônico, um ácido graxo da família ômega 6, dá origem principalmente a mediadores pró-inflamatórios, e constitui-se um alvo de terapias anti-inflamatórias comumente utilizadas (CALDER, 2009).

Os eicosanoides, resultantes do metabolismo dos fosfolipídios de membrana apresentam diversas atividades biológicas como a modulação da resposta inflamatória e resposta imunológica, influenciam na agregação plaquetária, e no crescimento e diferenciação celular (HARDMAN, 2004).

As resolvinas e protectinas resultantes do metabolismo do EPA e DHA presentes na membrana promovem atividade a favor da resolução dos processos inflamatórios através das propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras, atenuando a inflamação e a lesão mediada por células polimorfonucleares e granulócitos do sistema imunitário (SERHAN, 2006).

A variedade de efeitos biológicos dos AGPI n-6 e n-3 tem despertado interesse na investigação dos efeitos da suplementação de óleo de peixe sobre a inflamação, sistema imunitário e estresse oxidativo em humanos e ratos.

### **3.4.1. Óleo de peixe e marcadores da resposta imunitária**

A disponibilidade de ácidos graxos n-3 na dieta os coloca a disposição para a incorporação nas membranas celulares, levando a atenuação da resposta inflamatória em decorrência da alteração do perfil de eicosanóides produzidos (CALDER, 2009).

É sugerido que os AGPI n-3 têm ações anti-inflamatórias através da diminuição da quimiotaxia de leucócitos, da expressão de moléculas de adesão, e síntese de citocinas inflamatórias, sendo que estes efeitos podem ser atribuídos a redução da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Fator nuclear kappa B) pró-inflamatório, e aumento da ativação de fatores de transcrição anti-inflamatórios do conjunto de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gamma (PPAR $\gamma$ ) (VAN DEN BERGHE et al., 2003; CALDER, 2012).

Varney e colaboradores (2009) compararam a contagem de leucócitos entre ratos alimentados com dietas contendo alta concentração de óleo de peixe e de óleo de milho (baixo teor de n-3), e verificaram que aqueles que se alimentaram com a dieta Op obtiveram redução na produção de células progenitoras na medula óssea, sem alteração na contagem de leucócitos no sangue periférico. Em humanos, Mukaro e colaboradores (2008) verificaram que o consumo de dietas enriquecidas 1 g ao dia de ácidos graxos n-3 provenientes do óleo de peixe, incluídos no processamento dos alimentos, por um período de 6 meses, promoveu redução significativa na contagem de leucócitos, linfócitos e células Natural Killer (NK).

Em estudo que comparou o efeito de 4 dietas enriquecidas com óleo de peixe em diferentes concentrações com uma dieta controle isenta de óleo de peixe, foi verificado que o tratamento não promoveu alterações no peso do baço (HINDS & SANDERS, 1993). Rabbani e colaboradores (1999) verificaram que a administração de altas doses de óleo de peixe através de gavagem (5 ml /kg ao dia) em ratos na frequência de 5 vezes na semana pelo período de 13 semanas promoveu o aumento do peso do fígado nas fêmeas avaliadas e do baço em ambos os sexos.

Estudos sugerem que o n-3 influencia a transdução de sinal nos macrófagos e células T, alterando a concentração de citocinas pró-inflamatórias através da inibição da ativação do NF- $\kappa$ B (MILES & CALDER, 1998; CALDER, 2013).

Os ácidos graxos n-3 suprimem a expressão de genes pró-inflamatórios responsáveis envolvidos na produção de citocinas, quimiocinas, estímulo à ciclooxigenase, óxido nítrico sintetase, e metaloproteinases de matriz. Os efeitos anti-inflamatórios envolvem a inibição da ativação do NF- $\kappa$ B e ativação de receptores ativados por proliferadores de PPAR $\gamma$ . Ademais, os AGPI n-3 podem influenciar na expressão de genes envolvidos no desenvolvimento e diferenciação de células imunológicas e inflamatórias, como os macrófagos, monócitos, e células T (CALDER, 2013).

Alguns trabalhos têm demonstrado que os AGPI n-3 foram capazes de aumentar a expressão de células T auxiliares, redução da proliferação de células T quando submetidas à mitógenos e diminuição da atividade de linfócitos T citotóxicos e de células NK (CALDER, 1996; ENDRES et al., 1989; MEYDANI et al., 1993; LEE et al., 1985). De acordo com Attakpa e colaboradores (2009), os AGPI n-3 podem ter impacto significativo em estágios iniciais de diferenciação e desenvolvimento de células T, sendo que o DHA pode alterar o padrão

de diferenciação das células T, resultando em um fenótipo menos inflamatório.

Os AGPI n-3 podem reduzir a atividade fagocítica, adesão celular, e síntese de citocinas em macrófagos (POMPÉIA et al., 2000), e interferir na função das células apresentadoras de antígeno, reduzindo sua atividade (SANDERSON, YAQOOP, CALDER, 1997). Estudos têm mostrado que a suplementação AGPI n-3 reduz a função fagocitária de macrófagos peritoneais de ratos (REINER et al., 1993; BULLBUL et al., 2007).

Desta maneira, visto os efeitos do AGPI n-3 sobre o sistema imunitário relatados na literatura, há indícios de que estes ácidos graxos podem apresentar efeitos considerados imunossupressores.

### **3.4.2. Óleo de peixe, estresse oxidativo e lesão celular**

Os AGPI são, devido à presença de duplas ligações em suas cadeias hidrocarbônicas, susceptíveis ao ataque de espécies reativas (NORBERG & ARNÉR, 2001). As membranas celulares contêm grande quantidade de AGPI, e desta maneira são as estruturas celulares mais atingidas pelas espécies reativas, as quais desencadeiam uma cascata de eventos que podem culminar na morte celular. (YOSHIDA et al., 2003).

Foi observado em alguns trabalhos o aumento da peroxidação lipídica na membrana de eritrócitos e de ácidos graxos plasmáticos em ratos suplementados com óleo de peixe, em que ocorreu concomitantemente o incremento na necessidade de vitamina E (MIRET, SAÍZ & MITJAVILA, 2003; IBRAHIM et al. 1997; MCGUIRE et al., 1997).

Moreno e colaboradores (2003), em estudo que comparou a suplementação de óleo de oliva, óleo de milho e óleo de peixe em ratos, obtiveram como resultado o aumento na produção do ânion superóxido e do óxido nítrico em macrófagos peritoneais no grupo suplementado com óleo de peixe, mostrando que o óleo de peixe pode incrementar este parâmetro relacionado ao estresse oxidativo.

Kikuwaga e colaboradores (2003) observaram que, em ratos submetidos ao estresse oxidativo, a suplementação de óleo de peixe promoveu aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico quando comparado a suplementação de óleo de cártamo (n-6). Adicionalmente, foi observado que as concentrações de hidroperóxidos aumentaram no mesmo nível em ambos os grupos. Entretanto, os danos oxidativos ao DNA foram menores no grupo suplementado com óleo de peixe.

Outros trabalhos mostraram redução no estresse oxidativo em ratos suplementados com óleo de peixe. Niby e colaboradores (2005) mostraram que a suplementação com óleo de peixe em ratos hiperinsulinêmicos levou à prevenção da disfunção vascular, e esse efeito foi associado ao aumento da expressão da óxido nítrico sintetase e redução do estresse oxidativo.

Considerando que a atividade extracelular de enzimas de ação intracelular aumenta em resposta ao estresse oxidativo após o processo de lesão celular por peroxidação dos ácidos graxos presentes na membrana, (JOVANOVIĆ et al., 2010; VENKATARAMAN et al., 2009; BELL & KHAN, 1999), Yilmaz e colaboradores (2004) verificaram que a suplementação de 0,4 g/kg de óleo de peixe via gavagem durante 30 dias promoveu aumento da atividade da LDH no fígado de ratos, quando comparado aos animais do grupo controle que recebeu solução isotônica. Em estudo *in vitro* Sugihara e colaboradores (1994) verificaram que a exposição de hepatócitos ao ácido graxo n-3 eicosapentaenoico (EPA) promoveu injúria celular e aumento da liberação de LDH.

### **3.5. Dexametasona e óleo de peixe**

Salama e colaboradores (2012) avaliaram o efeito da ingestão de óleo de peixe isolada (1, 2 e 3 g/kg) e combinada (1,5 g/kg) com a administração de dexametasona (0,5 mg/kg) em ratos com bronquite asmática induzida por ovoalbumina, e observaram que o Op, isolado quanto associado com a Dex promoveu atenuação dos efeitos deletérios da ovoalbumina sobre a função pulmonar, redução da contagem de eosinófilos, e das concentrações de Imunoglobulina E sérica e do TNF- $\alpha$  no pulmão.

Em estudo que avaliou os efeitos da administração parenteral de emulsão de Op (1 ml/kg) sobre a cicatrização cutânea de queimaduras em ratos tratados com dexametasona (0,2 mg/kg), não foram observadas diferenças estatísticas nas concentrações de hidroxiprolina, TGF- $\beta$  (fator de crescimento), fator de crescimento derivado de plaquetas, nos escores de cicatrização, e na profundidade das feridas (GARCEK et al., 2007).

Estudos que avaliaram os efeitos sobre parâmetros imunitários e de estresse oxidativo relacionados à administração de óleo de peixe concomitante à dexametasona são escassos. Como exposto, a dexametasona promove imunossupressão e parece incrementar os parâmetros de estresse oxidativo. A imunossupressão está relacionada ao aumento da susceptibilidade a infecções, enquanto o aumento do

estresse oxidativo pode incrementar o risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Considerando que o óleo de peixe apresenta efeitos imunorreguladores e pode elevar os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, se faz necessário investigar se a ingestão do óleo de peixe pode acentuar os efeitos deletérios de imunossupressão e estresse oxidativo aumentado, ocasionados pela administração da dexametasona, já que o fármaco e o suplemento podem ser utilizados concomitantemente na prática clínica.

### **3.6. Hipótese**

#### **3.6.1. Hipótese nula**

O óleo de peixe não promove alterações nos parâmetros imunitários e marcadores de estresse oxidativo em ratos tratados com dexametasona.

#### **3.6.2. Hipótese alternativa**

O óleo de peixe modula negativamente parâmetros imunitários e incrementa marcadores de estresse oxidativo em ratos tratados com dexametasona.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Caracterização do estudo**

O presente estudo caracteriza-se como experimental, e foi desenvolvido no Laboratório de Investigação em Doenças Crônicas (LIDoC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Foram utilizados os mesmos animais da amostra do estudo prévio realizado no LIDoC pela mestrandia Amanda Marreiro Barbosa, intitulado “Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre alterações no metabolismo da glicose e dos lipídios induzidas por glicocorticoide em ratos”.

### **4.2. Animais de experimentação e aspectos éticos**

Foram submetidos ao estudo 60 ratos Wistar machos saudáveis no início do estudo com três meses de idade, mantidos em temperatura de aproximadamente 22° C, ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), em gaiolas coletivas e acesso livre a água e ração. Os ratos utilizados no estudo foram provenientes do Biotério Central da UFSC, localizado no Campus Trindade, Florianópolis, SC. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC através do protocolo PP00782 (Anexo A).

### **4.3. Desenho do estudo e grupos de tratamento**

Os grupos experimentais foram compostos por 60 animais no total, os quais foram tratados em 3 lotes em datas diferentes, divididos em: Grupo controle (CTL): ratos suplementados com óleo mineral (Mariol®), utilizado como placebo, e com administração de solução salina (NaCl 0,9%), Grupo Dex (DEX): ratos suplementados com óleo mineral e tratados com dexametasona (Decadron®, Aché, Campinas, SP, Brasil), Grupo óleo de peixe (OP): ratos suplementados com óleo de peixe (Phytomare®) e com administração de solução salina e Grupo Dex + óleo de peixe (DEXOP): ratos suplementados com óleo de peixe e tratados com dexametasona. A administração de Op na concentração de 1 g/kg, (YAMAZAKI et al., 2011; HIRABARA et al., 2012) e de óleo mineral a 1 g/kg foi realizada via orogástrica através de gavagem, e a administração de dexametasona (0,5 mg/kg) (SALAMA et al., 2012) e salina foi realizada via injeção intraperitoneal, em torno das 8 horas da manhã e por 15 dias consecutivos. Na administração do óleo mineral como placebo não absorvível, não foram observadas alterações na

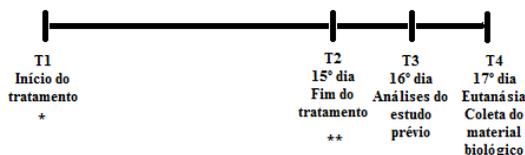
consistência das fezes. Os tratamentos ocorreram de forma simultânea, e os animais foram pesados diariamente para ajuste das dosagens do fármaco e do suplemento. A Tabela 2 mostra o tratamento e a suplementação a que cada grupo do estudo foi submetido.

Tabela 2. Tipo de tratamento e amostra por grupo experimental.

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Tratamento injetável</b>	<b>Suplementação via oral (gavagem)</b>
<b>CTL</b>	15	Placebo (solução salina)	Placebo Óleo mineral (1 g/kg)
<b>DEX</b>	15	Dexametasona (0,5 mg/kg)	Placebo Óleo mineral (1 g/kg)
<b>OP</b>	15	Placebo (solução salina)	Óleo de peixe (1 g/kg)
<b>DEXOP</b>	15	Dexametasona (0,5 mg/kg)	Óleo de peixe (1 g/kg)

A Figura 2 apresenta a sequência temporal de diferentes eventos referentes ao estudo.

Figura 2: Período de realização do estudo. T1: início da suplementação com óleo de peixe ou óleo mineral, administração de dexametasona ou solução salina, controle da ingestão alimentar e hídrica e do peso corporal; T2: Fim dos tratamentos. T3: análises do estudo realizado para verificar alterações em parâmetros da homeostase glicêmica e insulínica; T4: Eutanásia e coleta do material biológico que será utilizado nas análises posteriores.



**Legenda:**

\*Início do controle da ingestão alimentar e hídrica e do peso corporal

\*\*Fim do controle da ingestão alimentar e hídrica e do peso corporal

A Figura 3 traz informação nutricional das cápsulas de óleo de peixe fornecida pelo fabricante. A Tabela 3 mostra a análise da composição do óleo de peixe em ácidos graxos, realizada no presente estudo.

Figura 3: Informação nutricional das cápsulas de óleo de peixe.

<b>INFORMAÇÃO NUTRICIONAL</b>	
Porção 1,0 g	
Quantidade por porção	
Valor energético	8,5 kcal = 35,5 kJ
Gorduras totais, das quais:	1,0 g
Gorduras saturadas	0,35 g
Gorduras monoinsaturadas	0,25 g
Gorduras polinsaturadas	0,4 g
Ômega 3:	305 mg
EPA (ácido eicosapentaenóico)	183,5 mg
DHA (ácido docosahexaenóico)	121,5 mg
Colesterol	2,0 mg
Sódio	2,0 mg
Não contém quantidade significativa de carboidratos, proteínas, gorduras trans e fibra alimentar.	

Fonte: Adaptado da Ficha técnica do óleo de peixe encapsulado (Phytomare®).

Tabela 3: Composição do óleo de peixe Phytomare® em ácidos graxos:

<b>Porção de 1 g</b>	
<b>Ácido graxo</b>	<b>Proporção (%)</b>
Eicosapentaenoico (EPA)	24,66%
Docosaexaenoico (DHA)	17,12%
Palmítico	14,47%
Mirístico	13,83%
Araquidônico	10,95%
Oleico	10,06%
Linoleico	3,75%
Láurico	2,64%
Esteárico	1,88%
$\alpha$ -linolênico	0,64%

#### **4.4. Determinação da ingestão alimentar**

A ingestão de ração foi aferida diariamente, dada subtração do peso inicial pelo consumido, e a diferença, que representa o consumo total por gaiola, foi dividida entre o número total de animais a fim de aferir o consumo individual. Em trabalho anterior com outra linhagem de ratos Krohn e colaboradores (2011) observaram que a avaliação do consumo de ração dos animais mantidos em gaiolas coletivas mostrou resultado semelhante ao consumo de ratos mantidos em gaiolas individuais após a normalização do peso da ração pelo peso corporal, sendo que o isolamento parece não afetar o consumo alimentar. Outros estudos realizados em nosso grupo utilizaram o mesmo método de avaliação do consumo alimentar (RAFACHO et al., 2008; NUNES et al., 2013). Os dados de consumo de ração foram expressos em gramas ingeridos por quilograma de peso corpóreo no sentido de normalizar este parâmetro.

#### **4.5. Determinação da ingestão hídrica**

A ingestão hídrica foi aferida diariamente a partir da subtração do conteúdo remanescente de água pelo conteúdo depositado no momento inicial. O valor resultante da subtração representa o total de água ingerido diariamente por gaiola, e o consumo individual foi aferido através da divisão do volume total consumido pelo número de animais. Em estudo anterior com outra linhagem de ratos foi observado que a ingestão hídrica de ratos em gaiolas coletivas não é diferente da

verificada em ratos mantidos em gaiolas individuais (KROHN et al., 2011).

#### **4.6. Determinação do peso corporal**

A determinação do peso corporal foi realizada diariamente desde o dia que antecedeu o início do tratamento até o dia da eutanásia, em balança eletrônica digital (TECNAL, SP, Brasil).

#### **4.7. Coleta do material biológico**

No 16º dia de tratamento os ratos foram submetidos ao jejum de 12 horas, e sofreram eutanásia no 17º dia. Antes do procedimento os animais foram expostos a atmosfera rica em CO<sub>2</sub>, seguido por decapitação, e o sangue do tronco foi coletado em dois tubos de ensaio de vidro, sendo um deles heparinizado para leucograma e obtenção do plasma e o outro para coleta do soro. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 400 x g por 15 minutos a 22°C, soro e plasma foram aliquotados e armazenados a -80°C para análises posteriores.

Após a coleta do sangue do tronco foram removidos fígado, timo e baço, os quais foram pesados.

O material biológico foi coletado em três datas e lotes diferentes, e dividido entre as análises realizadas. Desta forma alguns experimentos apresentam valores amostrais distintos.

#### **4.8. Análises biológicas**

##### **4.8.1. Contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos**

A contagem e proporções de leucócitos, granulócitos, monócitos e linfócitos foi obtida através da leitura do sangue heparinizado, antes da separação do plasma, no equipamento Advia 60 Hematology Analyzer. Os valores absolutos foram expressos em 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>, e os relativos em percentuais.

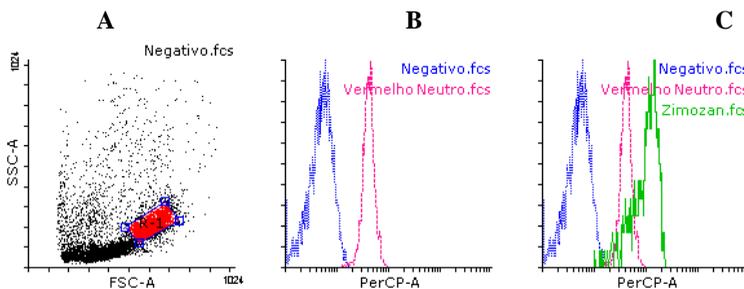
##### **4.8.2. Determinação da funcionalidade celular e atividade fagocitária de monócitos e neutrófilos sanguíneos**

Com o objetivo de determinar a funcionalidade de neutrófilos e monócitos foi utilizado o método descrito por Antal e colaboradores

(1995). O sangue heparinizado foi adicionado de solução preparada com PBS e vermelho neutro, em seguida aliqotado e acrescido de solução hemolítica, e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação a amostra foi centrifugada a 250 g durante 10 minutos a 4°C, ao final o sobrenadante foi descartado, e a amostra foi lavada com PBS. As amostras utilizadas no teste de funcionalidade celular foram incubadas com zimozan e PBS a 37°C antes do acréscimo do vermelho neutro. Após os procedimentos experimentais, as amostras negativas acrescidas de vermelho neutro, e as amostras para o teste de funcionalidade celular foram submetidas a leitura no citômetro de fluxo BD FACSCanto II e os dados analisados no software Flowing versão 2.5.1.

A Figura 4 apresenta os gráficos representativos da análise da proporção de neutrófilos e monócitos no sangue (A), do modelo de análise da atividade celular a partir da incorporação do vermelho neutro (B) e do modelo de análise da função fagocítica após serem estimuladas com zimozan (C), obtidos por citometria de fluxo. Os resultados das leituras sobre a intensidade da fluorescência foram expressos em unidades arbitrárias.

Figura 4: Gráficos de citometria de fluxo representativos dos neutrófilos e monócitos de um rato do grupo CTL.



A: A região R-1 representa as células com características morfológicas de neutrófilos e monócitos (SSC-A: *Side scatter*; FSC-A: *Forward scatter*). B: Representa o modelo de análise utilizado para determinar a atividade das células a partir da subtração das intensidades de fluorescência das células coradas com vermelho neutro pelas células negativas. C: Representa o modelo de análise para a determinação da função fagocitária a partir da subtração da intensidade da fluorescência das células estimuladas com zimozan pelas células coradas com vermelho neutro e negativas, em unidades arbitrárias.

### **4.8.3. Quantificação da Proteína C-Reativa, albumina, determinação da atividade da LDH e CK no soro**

O soro foi descongelado, e em seguida submetido aos testes com kits comerciais de acordo com as instruções presentes na bula de cada analito (fabricante Biotécnica®). As concentrações dos reagentes, da amostra, do padrão e da curva (quando aplicável) foram reduzidos respeitando as proporções estabelecidas na bula, para que a leitura fosse realizada em microplacas.

Para acessar as concentrações de PCR utilizou-se na curva padrão 125 µL de calibrador puro (concentração de 8 mg/L de PCR) para o fator de diluição 1, e diluído com salina até o fator de diluição 16; para a curva do branco foram utilizados 125 µL de salina. No teste foram utilizados 200 µL de reagente (160 µL de RDIL para 40 µL de RLAX) para cada 2 µL de amostra, sendo o ensaio executado em triplicata e em microplaca. A leitura foi realizada em leitor de placas (Apollo-8 Microplate Absorbance Reader LB 912- Berthold Technologies) em 540 nm.

Na avaliação das concentrações de albumina foram utilizados 200 µL de reagente com 1 µL de solução padrão, e 1 µL de amostra em triplicata. O experimento foi realizado em microplaca, e a leitura em leitor de placas (Apollo-8 Microplate Absorbance Reader LB 912- Berthold Technologies) em 630 nm (600 a 640 nm).

Para avaliar a atividade da LDH foram utilizados 200 µL de reagente de trabalho e 4 µL de amostra. No caso da CK foram utilizados 200 µL de reagente de trabalho e 8 µL de amostra. Ambos experimentos foram realizados em triplicata e em microplaca, e a leitura realizada na Multileitora Infinite M200 TECAN em 340 nm a 37°C.

### **4.8.4. Determinação da concentração de hidroperóxidos lipídicos no plasma**

Foi utilizado o método descrito por Nourooz-Zadeh et al. (1994). O plasma foi homogeneizado com metanol a 1:5 e centrifugado a 5000 x g, por 5 minutos a 4°C. Para cada poço de uma placa foram transferidos 18 µl do sobrenadante, num total de 6 poços por amostra. Adicionou-se 2 µL de TPP a 10 mM (os hidroperóxidos são convertidos em hidroxila pela trifetilfosfina) em 3 poços, e nos 3 restantes adicionou-se 2 µL metanol. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos; foram adicionados 180 µl de FOX-2 (constituído de xilenol laranja 100 mM, hidroxitolueno butilado 4 nM,

ácido sulfúrico 25 nM e sulfato ferroso de amônio 250 nM, em metanol 90%), e incubados novamente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Os cátions ferrosos presentes na solução FOX2 são oxidados pelos hidroperóxidos na amostra, não somente pelos hidroperóxidos lipídicos, formando  $\text{Fe}^{3+}$  sendo que nas amostras já acrescentadas de TPP essa oxidação é menor. A leitura das placas foi realizada a 550 nm utilizando leitor de microplacas (Apollo-8 Microplate Absorbance Reader LB 912- Berthold Technologies). O valor da absorbância das amostras não adicionadas de TPP foi subtraído do valor da absorbância das amostras tratadas com TPP (sem hidroperóxidos lipídicos), obtendo somente a quantidade de ferro oxidado por hidroperóxidos lipídicos. A curva padrão foi realizada com quantidades conhecidas de peróxido de hidrogênio (concentrações de 100 a 1,56  $\mu\text{M}$ ), submetidas aos mesmos procedimentos das amostras, sem acrescentar TPP. Dividiu-se o valor da concentração de hidroperóxidos lipídicos pela concentração de proteínas totais do extrato metanólico, sendo que a concentração de proteína nas amostras foi mensurada pelo método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteínas.

#### **4.8.5. Dosagem da concentração de proteínas carboniladas no plasma**

Para dosar a oxidação de proteínas foi utilizado o método descrito por Levine e colaboradores (1990), que se baseia no princípio de que os radicais livres atacam resíduos de proteínas para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O plasma foi fracionado em alíquotas de 100  $\mu\text{L}$ , que foram misturadas com 600  $\mu\text{L}$  de DNPH 10 mM e 600  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico (HCl) 0,2 N (branco da amostra); os tubos foram mantidos à temperatura ambiente em abrigo da luz, durante 60 minutos, e agitados a cada 10 minutos. Posteriormente foram adicionados aos tubos 600  $\mu\text{L}$  de TCA 20%, submetidos à agitação novamente, e mantidos sob as mesmas condições de temperatura e iluminação por 10 minutos. Em seguida foram centrifugados a 11000 x g por 5 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado três vezes com 800  $\mu\text{L}$  de etanol-acetato de etila (1:1). Após esse processo, os tubos foram centrifugados a 15000 x g por 5 minutos a 4°C, e a absorbância do sobrenadante foi lida em 360 nm, contra a solução de uréia 8,0 M. Para a determinação da quantidade de proteínas totais, o sobrenadante do branco foi lido em 280 nm. O conteúdo de carbonil foi determinado espectrofotometricamente no equipamento

Multileitora Infinite M200 TECAN em 370 nm e calculado em nmol/mg de proteínas usando um coeficiente de extinção molar de  $22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.9. Análise Estatística**

Os dados foram inseridos em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2007® com dupla entrada. A análise estatística foi realizada no programa estatístico Graphpad Prism v.5.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA). As variáveis foram descritas e apresentadas em média e erro padrão da média (EPM), quando a distribuição era simétrica, ou em mediana e intervalo interquartil quando assimétrica. Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicada avaliação do coeficiente de variação (CV) em conjunto com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para comparação múltipla dos dados simétricos foi utilizado o teste ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis, quando as variáveis expressaram distribuição assimétrica, seguido de teste de Dunn. Para caracterização do modelo experimental foi utilizado o teste t-Student para variáveis simétricas e o teste de Mann-Whitney para variáveis assimétricas. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Caracterização do modelo experimental**

Concordando com os dados disponíveis na literatura, os animais tratados com Dex apresentaram redução significativa no peso corpóreo final, e alterações em parâmetros imunitários mostradas através da redução do peso do baço, da contagem de linfócitos e da atividade fagocitária, como exposto na Tabela 4. Entretanto, contrariando o esperado, o grupo DEX não apresentou alterações no peso no timo, na contagem de leucócitos, nos marcadores de estresse oxidativo e de lesão celular avaliados. A ausência de alterações em alguns dos parâmetros analisados no presente estudo pode estar associada ao binômio dose-tempo, bem como do material biológico utilizado, que para alguns parâmetros diferem dos demais estudos citados.

Tabela 4: Avaliação do peso corpóreo, parâmetros imunitários, marcadores de estresse oxidativo e de lesão celular de ratos controle (CTL) e tratados com 0,5 mg/kg de Dex (DEX) durante 15 dias.

	CTL	DEX	Expectativa de alteração no grupo DEX	Encontrado no estudo
<b>Peso corpóreo final (g)</b>	350,0 ± 13,5	268,3 ± 15,7	↓ <sup>a</sup>	↓
<b>Peso do Timo (mg/g p.c.)</b>	1,28 [1,22-1,70]	1,26 [1,05-1,73]	↓ <sup>b</sup>	↔
<b>Peso do Baço (mg/g p.c.)</b>	2,35 [2,32-2,61]	1,70 [1,38-1,84]	↓ <sup>c</sup>	↓
<b>Contagem de leucócitos no sangue (x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	10,6 [7,8-11,5]	8,6 [5,8-11,0]	↑ <sup>d</sup>	↔
<b>Contagem de linfócitos no sangue (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	7,0 [5,3-7,5]	3,2 [2,2-3,4]	↓ <sup>e</sup>	↓
<b>Atividade fagocitária de neutrófilos e monócitos (UA)</b>	68,3 [55,8-84,8]	49,6 [47,7-51,5]	↓ <sup>f</sup>	↓
<b>Lipoperóxidos (mmol/mg de proteínas)</b>	0,07 [0,05-0,08]	0,05 [0,03-0,10]	↑ <sup>g</sup>	↔
<b>Atividade da LDH (U/L)</b>	238,0 [202,6-273,3]	353,3 [248,2-370,2]	↑ <sup>h</sup>	↔
<b>Atividade da CK (U/L)</b>	1413 [1268-1627]	1213 [1105-1296]	↑ <sup>i</sup>	↔

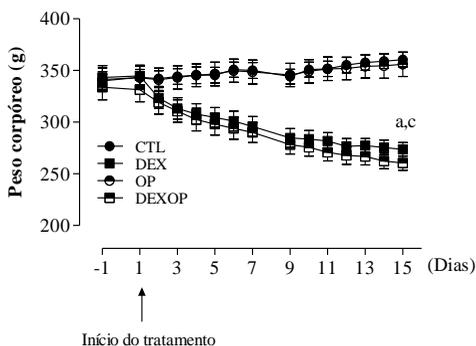
Dados apresentados como média ± EPM, analisados por meio do teste t-Student. Dados apresentados em mediana e intervalo interquartil, analisados por meio do teste de Mann-Whitney, p<0,05. ↓ reduzido em relação ao grupo controle; ↑ aumentado em relação ao grupo controle; ↔ sem alteração em relação ao grupo controle. UA: unidades arbitrárias. LDH: Lactato Desidrogenase. CK: Creatinocinase. <sup>a</sup>ORZECOWSKI et al., 2000; FILARETOVA et al., 2009; SMINK et al., 2003. <sup>b</sup>BATISTA, MARTINS & VASCONSELOS, 2005; FRAWLEY et al, 2010. <sup>c</sup>NAKAO et al., 2014; ORZECOWSKI et al., 2002;

PERANDONES et al., 1993. <sup>d,e</sup>OHKARU et al., 2010; AMAR et al., 2013. <sup>f</sup>GRASSO, KLEIN & BENJAMIN, 1981; BECKER & GRASSO, 1985; NAKAMURA, MURAI & OGAWA, 1996; MLAMBO & SIGOLA, 2003. <sup>g</sup>MENDEZ-ARMENTA et al., 2003; LINGAIAH et al., 2012. <sup>h,i</sup>RAJASHREE & PUVANAKRISHNAN, 1998; ORZECOWSKI et al., 2002.

#### 4.10. Evolução do peso corporal

A Figura 5 mostra a evolução do peso corporal dos ratos ao longo do tratamento. Observou-se redução progressiva da massa corporal em ambos os grupos tratados com Dex após o segundo dia de tratamento, e ao final exibiram redução significativa em relação ao grupo CTL e ao grupo OP. O óleo de peixe não influenciou no peso corporal dos animais tratados com Dex.

Figura 5: Evolução do peso corporal (g) de ratos controle (CTL), tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias.



Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (g). <sup>a</sup>Indica diferença significativa em relação ao CTL ao final do tratamento. <sup>c</sup>Indica diferença significativa em relação ao OP ao final do tratamento. Foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ,  $n = 10$ .

#### 4.11. Consumo de ração e ingestão hídrica

O consumo de ração e de água relativo ao peso corpóreo (p.c.) mostrou redução estatisticamente significativa apenas dos grupos DEX e DEXOP em relação ao CTL. A suplementação de óleo de peixe não promoveu alterações no consumo de ração e de água relativos, reduzidos pela administração da Dex.

Tabela 5: Consumo de ração (g/kg p.c.) e de água (ml/kg p.c.) de ratos controle (CTL), tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias.

	CTL	DEX	OP	DEXOP
<b>Consumo de ração (g/kg de p.c.)</b>	22,2±0,3	19,9±0,6 <sup>a</sup>	20,0±0,6	18,4±0,5 <sup>a</sup>
<b>Consumo de água (ml/kg de p.c.)</b>	42,0±2,1	31,4±4,3 <sup>a</sup>	32,2±1,1	27,5±0,8 <sup>a</sup>

Dados apresentados em média ± EPM. <sup>a</sup>Indica diferença estatística significativa em relação ao CTL. Teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ,  $n = 10$ .

#### 5.4. Peso do timo, fígado e baço

De acordo com a Tabela 6 pode-se observar que o peso fígado e o do baço foi influenciado pela administração isolada da Dex, e a suplementação com Op não influenciou nesse parâmetro ao comparar os grupos DEX e DEXOP. O peso do timo não foi alterado pela imunossupressão mediada via Dex e pela suplementação com óleo de peixe.

Tabela 6: Peso relativo do timo e fígado de ratos controle (CTL), tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias (mg de tecido/kg de p.c.).

	CTL	DEX	OP	DEXOP
<b>Timo (mg/g de p.c.)</b>	1,28 [1,22-1,70]	1,26 [1,05-1,73]	1,22 [0,95-1,38]	1,53 [1,10-1,88]
<b>Fígado (mg/g de p.c.)</b>	32,7±0,7	39,0±1,8 <sup>a</sup>	33,6±1,0	40,4±2,4 <sup>a</sup>
<b>Baço (mg/g de p.c.)</b>	2,35 [2,32-2,61]	1,70 [1,38-1,84] <sup>a</sup>	2,08 [2,06-2,14]	1,84 [1,61-2,05]

Dados sobre o peso do timo e baço apresentados em mediana e intervalo interquartil (mg/g de p.c.). Teste de Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn  $p < 0,05$ ,  $n = 10$ . Dados sobre o peso do fígado apresentados em média  $\pm$  EPM. Teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ,  $n = 10$ .

<sup>a</sup>Indica diferença estatística significativa em relação ao CTL.

### 5.5. Contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos

Como pode ser observado na Tabela 7, a administração de Dex associada ao óleo de peixe não promoveu diferenças estatisticamente significativas na contagem de leucócitos e linfócitos quando comparada a administração isolada de DEX. Entretanto, observa-se que houve uma tendência na redução da contagem de leucócitos (DEX=8,6 [5,8-11,0] e DEXOP =7,5 [5,9-11,0]  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ), linfócitos (DEX=3,2 [2,2-3,4] e DEXOP =1,8 [1,4-3,5]  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ), de monócitos (DEX=2,0 [1,2-3,6] e DEXOP=1,3 [1,0-2,8]  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) e de aumento na contagem de granulócitos (DEX=3,4 [2,0-4,8] e DEXOP=4,2 [2,6-5,5]  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ).

Tabela 7: Contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos de ratos controle (CTL), tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ).

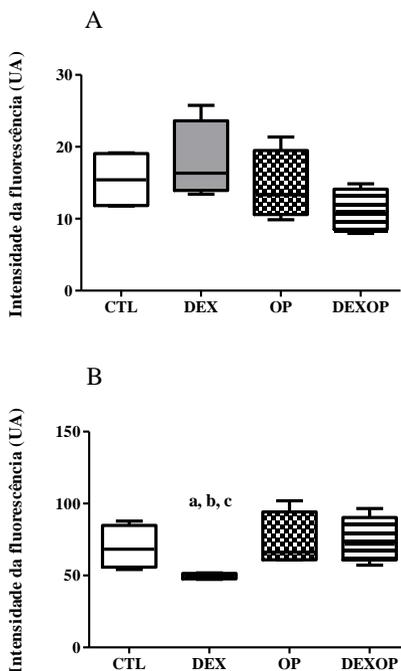
	CTL	DEX	OP	DEXOP
<b>Leucócitos</b>	10,6 [7,8-11,5]	8,6 [5,8-11,0]	11,7 [10,0-13,0]	7,5 [5,9-11,0] <sup>c</sup>
<b>Linfócitos</b>	7,0 [5,3-7,5]	3,2 [2,2-3,4] <sup>a,c</sup>	7,8 [7,0-9,1]	1,8 [1,4-3,5] <sup>a,c</sup>
<b>Monócitos</b>	1,2 [0,6-1,3]	2,0 [1,2-3,6]	1,2 [1,0-1,5]	1,3 [1,0-2,8]
<b>Granulócitos</b>	2,2 [1,6-2,6]	3,4 [2,0-4,8]	2,4 [1,6-3,1]	4,2 [2,6-5,5] <sup>a,c</sup>

Valores apresentados em mediana e intervalo interquartil ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ). <sup>a</sup>Indica diferença estatística significativa em relação ao CTL. <sup>c</sup>Indica diferença estatística significativa em relação ao OP. Teste de Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn,  $p < 0,05$ ,  $n = 10$ .

### 5.6. Determinação da funcionalidade celular e atividade fagocitária de monócitos e neutrófilos sanguíneos

Conforme a Figura 6 (A) a administração de Dex não alterou a intensidade da fluorescência das células coradas com vermelho neutro quando comparado com os demais grupos. Entretanto a suplementação com óleo de peixe no grupo tratado com Dex (DEXOP) apresentou uma tendência à redução na fluorescência das células quando comparada a administração isolada de Dex ( $p = 0,057$ ). A figura 6 (B) mostra que quando estimulado com zimozan o grupo tratado com Dex e suplementado com Op (DEXOP) exibiu atividade fagocítica significativamente mais intensa do que o grupo DEX. Os grupos CTL, OP e DEXOP não obtiveram diferença na atividade fagocítica entre eles, e todos foram superiores ao grupo DEX ( $p < 0,05$ ). Desta maneira o óleo de peixe parece melhorar a atividade fagocítica dos neutrófilos e monócitos quando submetidos à administração de Dex.

Figura 6: Atividade celular mediada pela incorporação do vermelho neutro (A) e função fagocitária de neutrófilos e monócitos conforme a intensidade da fluorescência pela captação do vermelho neutro estimulada por zimozan (B), em ratos CTL, tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias (unidades arbitrárias).



Dados apresentados em mediana e intervalo interquartil (unidades arbitrárias). <sup>a</sup>Indica diferença estatística significativa em relação ao CTL. <sup>b</sup>Indica diferença estatística significativa em relação ao DEXOP. <sup>c</sup>Indica diferença estatística significativa em relação ao OP. Teste de Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ .

### 5.7. Determinação da concentração de Proteína C-Reativa e albumina, e da atividade da LDH e CK no soro.

A Tabela 8 mostra que a suplementação com óleo de peixe no grupo tratado com Dex não alterou a concentração de PCR quando comparada ao grupo que recebeu Dex de forma isolada. O grupo tratado com Dex obteve aumento na concentração de albumina ( $4,60 \pm 0,37$  g/dL) quando comparado ao grupo CTL ( $4,03 \pm 0,23$  g/dL) ( $p = 0,03$ ). A

suplementação com óleo de peixe associada a Dex no grupo DEXOP não mostrou alterações estatisticamente significativas em relação do grupo DEX.

Em relação a atividade das enzimas LDH e CK não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos estudados.

Tabela 8: Concentrações de PCR (mg/L) e albumina (g/L) e atividade enzimática da LDH e CK (U/L) nos ratos CTL, tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias.

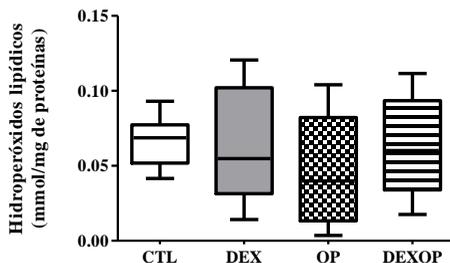
	CTL	DEX	OP	DEXOP
<b>PCR (mg/L)</b>	0,37 ± 0,030	0,36 ± 0,020	0,36 ± 0,002	0,39 ± 0,050
<b>Albumina (g/dL)</b>	4,03 ± 0,23	4,6 ± 0,37 <sup>a</sup>	4,30 ± 0,23	4,40 ± 0,45
<b>LDH (U/L)</b>	238,0 [202,6 -273,3]	353,3 [248,2 -370,2]	274,0 [239,0 -250,0]	291,6 [249,3 -443,3]
<b>CK (U/L)</b>	1413 [1268-1627]	1213 [1105-1296]	1455 [1185-1612]	1021 [790-1251]

Valores sobre as concentrações de PCR e albumina apresentados em média ± EPM. Teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ,  $n=5$  (PCR) e  $n=5$  (Albumina). Dados sobre a atividade da LDH e CK apresentados em mediana e intervalo interquartil (U/L). Teste de Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn  $p < 0,05$ ,  $n=5$  (LDH) e  $n=5$  (CK). <sup>a</sup>Indica diferença estatística significante em relação ao CTL.

### 5.8. Determinação da concentração plasmática de hidroperóxidos lipídicos

A Figura 7 mostra que as concentrações plasmáticas de hidroperóxidos lipídicos não foram estatisticamente diferentes entre os grupos estudados. Porém os grupos tratados com Dex exibem tendência a concentrações superiores quando comparados aos grupos CTL e OP.

Figura 7: Concentração de hidroperóxidos lipídicos no plasma de ratos CTL, tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias (mmol/mg de proteínas).

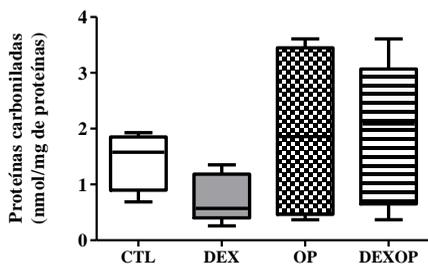


Dados apresentados em mediana e intervalo interquartil ( $\mu\text{mol/mg}$  de proteínas). Teste de Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ .

### 5.9. Determinação da concentração plasmática de proteínas carboniladas

De acordo com a Figura 8, observa-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, porém houve uma tendência de aumento nas concentrações de proteínas carboniladas no plasma dos animais dos grupos suplementados com óleo de peixe (DEXOP e OP).

Figura 8: Concentração de proteínas carboniladas no plasma de ratos CTL, tratados ou não com 0,5 mg/kg de Dex e suplementados ou não com 1 g/kg de Op, durante 15 dias (nmol/mg de proteínas).



Dados apresentados em mediana e intervalo interquartil (nmol/mg de proteínas). Teste de Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ .



## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que o tratamento com Dex promoveu a redução do peso corporal, da ingestão alimentar, da ingestão hídrica, do peso do baço, da contagem de linfócitos, e o aumento das concentrações de albumina. Esses resultados são concordantes com outros autores em estudos anteriores (ORZECOWSKI et al., 2000; FILARETOVA et al., 2009; SMINK et al., 2003). A suplementação de óleo de peixe promoveu o incremento da função fagocitária nos ratos tratados com Dex.

O resultado referente a perda de peso foi semelhante ao encontrado por Fappi e colaboradores (2014), que observaram que a suplementação com óleo de peixe (100 mg/kg/dia de DHA+EPA) em ratos submetidos ao tratamento com 5 mg/kg de Dex durante 10 dias não reverteu o efeito da administração isolada da Dex sobre a perda de peso, o qual foi significativamente maior quando estes grupos foram comparados ao grupo CTL. A redução da massa corporal pode ser resultante da desidratação devido ao aumento da excreção de água e sódio, mediada pelas alterações em eixos endócrinos que regulam o balanço hídrico, ocorridas em resposta à administração da Dex (TUNHORST, BELTZ & JOHNSON, 2007).

A redução no peso do baço causada pela Dex observada neste estudo também foi encontrada em outros estudos com ratos tratados com Dex (NAKAO et al., 2014; ORZECOWSKI et al., 2002), e pode decorrer do efeito citotóxico promovido pelo estresse oxidativo aumentado pela administração deste fármaco (ORZECOWSKI et al., 2002). Segundo Perandones e colaboradores (1993) a Dex promove a apoptose de linfócitos no baço, o que pode contribuir para a redução do peso deste órgão, corroborando com a redução na contagem de linfócitos no sangue observada nos ratos que foram tratados. A suplementação de óleo de peixe no grupo DEXOP não promoveu incremento na redução do peso do baço ocorrida em resposta à administração isolada da Dex, já que os resultados para estes dois grupos foram semelhantes. Entretanto alguns autores observaram que a suplementação de óleo de peixe via gavagem, bem como a adição deste suplemento alimentar à dieta promoveu o aumento do peso do baço em ratos (RABBANI, 2001; NIELSEN, 2009). Outros estudos que testaram a suplementação com óleo de peixe em modelo de hipoperfusão cerebral, e de alterações enzimáticas no fígado induzidas por fenobarbital, também obtiveram como resultado o aumento do peso do baço (FARKAS et al., 2002; KO et al., 2000). Desta maneira observa-se

que o óleo de peixe pode promover um aumento no peso do baço em situações de saúde ou em situações de alterações fisiológicas, e estes resultados não foram observados no modelo estudado. Estes resultados podem se relacionar à dose de óleo de peixe suplementada, que não foi capaz *per se* de incrementar o peso do baço e de contrapor os efeitos imunossupressores da dose de Dex administrada. O tratamento com Dex promoveu redução significativa da contagem de linfócitos no sangue quando comparado ao grupo não tratado. Ohkaru e colaboradores (2010) observaram redução significativa na contagem de leucócitos e linfócitos em ratos tratados com 1 mg/kg de peso Dex via intraperitoneal durante 10 dias. Amar e colaboradores (2013) também observaram que ratas tratadas com 60 mcg/kg de peso de Dex via oral exibiram decréscimo na contagem de leucócitos. Sabe-se que a administração de glicocorticoides promove a redução na concentração dos linfócitos circulantes no sangue, ao passo que as concentrações destas células aumentam na medula óssea, ocasionando uma imunossupressão periférica quantitativa por meio da redução da contagem de linfócitos (FAUCI, 1975). Sendo assim, os resultados obtidos sobre a contagem de células imunitárias se assemelharam com os dados disponíveis na literatura. O grupo DEXOP apresentou redução significativa na contagem de linfócitos, e incremento na contagem de granulócitos, quando comparado ao grupo controle. Ainda que o efeito da suplementação de óleo de peixe sobre a contagem de leucócitos e linfócitos no grupo DEXOP não tenha sido estatisticamente diferente do grupo tratado isoladamente com Dex houve tendência à redução na contagem destes dois grupos de células; desta forma parece que o óleo de peixe pode promover o incremento na função imunossupressora da Dex, quando avaliada por meio da contagem de leucócitos. Arnardottir e colaboradores (2012) mostraram em seu estudo que a ingestão de óleo de peixe através da dieta (25 g/kg de ração) não alterou a contagem de leucócitos, monócitos, linfócitos e neutrófilos em camundongos. Apesar de o óleo de peixe não apresentar efeito imunossupressor sobre a contagem de células imunitárias quando administrado isoladamente, a sua suplementação associada ao tratamento com Dex pode incrementar os efeitos imunossupressores deste fármaco.

Observamos em nosso estudo que o tratamento com Dex promoveu redução significativa na atividade fagocitária em relação ao CTL. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos que avaliaram a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais (GRASSO, KLEIN & BENJAMIN, 1981; BECKER & GRASSO, 1985), de macrófagos provenientes dos alvéolos pulmonares (NAKAMURA,

MURAI & OGAWA, 1996), e do baço (MLAMBO & SIGOLA, 2003). Lim e colaboradores (2007) observaram que a atividade fagocítica aumentou em baixas concentrações circulantes de glicocorticoide, ao passo que altas doses provocaram redução deste parâmetro no sangue de ratos, concluindo que estes efeitos antagonistas são dose-dependentes, e a imunossupressão mediada por altas doses circulantes de glicocorticoide sobre a função fagocitária decorre de um mecanismo que envolve a ativação de genes via receptor de glicocorticoide.

Mostramos também em nosso estudo que a suplementação com óleo de peixe atenuou os efeitos imunossupressores da Dex sobre a função fagocítica de neutrófilos e monócitos nos ratos DEXOP, os quais exibiram valores semelhantes ao grupo controle. Alguns estudos *in vitro* têm mostrado que a exposição de monócitos e neutrófilos aos AGPI n-3 promove aumento na capacidade fagocitária em ratos e caprinos (PASCHOAL et al., 2013; LECCHI et al., 2011; PISANI et al, 2009). De acordo com Paschoal e colaboradores (2013) os ácidos graxos quando incorporados nos fosfolipídios das membranas celulares alteram sua fluidez, promovendo um importante efeito positivo na atividade fagocitária, e este efeito é proporcional a quantidade de insaturações dos ácidos graxos, o que possivelmente explica o ocorrido no presente estudo. Ainda que o óleo de peixe em combinação com a Dex exerça uma redução na contagem de leucócitos totais, parece incrementar o número de granulócitos no sangue, que pode ser atribuído ao aumento na contagem de neutrófilos, concordando com os achados para o aumento da funcionalidade destas células, atenuando a ação imunossupressora da Dex sobre a atividade fagocitária. Observa-se então, que a suplementação com óleo de peixe pode contrapor os efeitos desejados do uso da Dex em curto prazo.

Em relação aos marcadores de processo inflamatório observa-se que a Dex promoveu aumento da concentração da albumina, resultados semelhantes aos encontrados em outros estudos (GIOZZET et al., 2008; SANTOS, RAFACHO & BOSQUEIRO, 2007). É sabido que a expressão do gene relacionado a síntese da albumina em hepatócitos de ratos é regulada pelos glicocorticoides, modulada por outros hormônios como glucagon e adrenalina, e a transcrição do mesmo é estimulada pela Dex (NAWA et al., 1986). Ainda que a albumina tenha apresentado incremento nos ratos tratados com Dex, as concentrações de PCR não foram alteradas. A Dex promove decréscimo nas concentrações de PCR em diversas situações de exacerbação da resposta inflamatória (FOGEL et. al, 2014; LINDBERG et. al, 2003; VERHOEF et. al, 1999; OTTERNESS et. al, 1991), e a ausência de alterações nesse marcador no

presente estudo pode estar relacionada à inexistência de processo inflamatório no modelo estudado. A suplementação de óleo de peixe não implicou em alterações na concentração de albumina e PCR nos ratos DEXOP quando comparados aos ratos que receberam Dex de forma isolada. Hong e colaboradores (2015) observaram redução nas concentrações de PCR em ratos suplementados com óleo de peixe, porém a ausência de alterações no presente estudo pode ser relacionada a ausência de processo inflamatório no modelo utilizado, ou à dose do suplemento administrada.

A determinação da peroxidação lipídica e da concentração de proteínas carboniladas revelou que a administração isolada da Dex não teve efeitos nestes parâmetros. Estes resultados contrariam alguns trabalhos que utilizaram doses superiores deste fármaco em ratos, e apresentaram incremento dos marcadores de estresse oxidativo em tecidos (MENDEZ-ARMENTA et al., 2003; LINGAIAH et al., 2012; MANJARI & DAS, 2000). Entretanto os resultados do presente estudo concordam com o trabalho de Barichello e colaboradores (2011) que verificaram que a administração de doses inferiores de Dex (0,2 mg/kg) durante 7 dias não foi suficiente para promover alterações nas concentrações de malonaldeído e proteínas carboniladas no cérebro de ratos.

O processo de lesão celular pode decorrer do estresse oxidativo, como mostrado anteriormente. Da mesma maneira que não foram observadas alterações em marcadores de estresse oxidativo, não foram encontradas diferenças estatísticas na atividade da CK e LDH (marcadores de lesão celular) nos ratos tratados com Dex em relação aos demais grupos. Entretanto, alguns estudos que avaliaram a administração de doses superiores de Dex obtiveram incremento da atividade destas enzimas no soro e em tecidos, e correlacionaram estes resultados com elevado grau de dano oxidativo ao qual os mesmos foram submetidos via Dex (ORZECOWSKI et al., 2001; RAJASHREE & PUVANAKRISHNAN, 1998).

Ainda que tenha sido esperado um incremento nas concentrações de hidroperóxidos lipídicos e proteínas carboniladas no grupo suplementado com óleo de peixe e tratado com Dex (DEXOP) em relação ao grupo tratado isoladamente com Dex, estas alterações não foram detectadas no presente estudo. Alguns trabalhos têm mostrado que a suplementação com óleo de peixe em ratos pode incrementar os marcadores de estresse oxidativo devido a incorporação de AGPI na membrana celular (Moreno et al., 2003; Kikuwaga et al., 2003). É sabido que os AGPI n-3 presentes na membrana celular deixam-nas

mais suscetíveis a peroxidação lipídica, que pode culminar em lesão celular e promover o incremento nas concentrações da LDH e CK, fato este que foi observado em outros estudos (YILMAZ et al., 2004; SUGIHARA et al., 1994; HONG et al., 2015). Manjari e Das (2000) em seu estudo avaliaram os efeitos da associação da suplementação de 40 µl/kg de peso de óleo de peixe com tratamento com 5 mg/kg de Dex durante 10 dias sobre o estresse oxidativo, e verificaram que não houve diferenças em relação ao tratamento isolado com a mesma dose de Dex nas concentrações de malonaldeído no fígado e no plasma, e na atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase; desta maneira os resultados do presente estudo parecem concordar com o encontrado pelos autores. Corroborando com a ausência de alterações em marcadores de estresse oxidativo, também não se observou alterações nos marcadores de lesão celular (LDH e CK) nos ratos DEXOP quando comparados aos que receberam Dex, exclusivamente.

Desta forma, a ausência de alterações nos marcadores de lesão celular e de estresse oxidativo em reação ao tratamento com a Dex e à suplementação com óleo de peixe podem ser atribuídas à duração do tratamento, à dose do fármaco e do suplemento utilizada.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados encontrados, observou-se que a redução da atividade fagocitária de neutrófilos e monócitos provocada pela Dex foi atenuada pela suplementação com óleo de peixe, retornando a função normal, contrariando nossa hipótese. Este resultado parece mostrar benefício na atenuação da atividade de fagócitos, potencialmente, melhorando a capacidade de defesa do organismo, porém podendo reduzir o efeito farmacológico da Dex a qual é geralmente utilizada com o objetivo de atenuar o processo inflamatório. Ainda que muitos estudos mostrem que tanto a Dex quanto a suplementação com óleo de peixe podem incrementar os marcadores de estresse oxidativo e de lesão celular, e que a nossa hipótese seja um incremento ainda maior destes parâmetros no grupo que recebeu os dois tratamentos, os nossos resultados não concordam com estes achados, o que pode decorrer do binômio dose-tempo da suplementação com óleo de peixe e tratamento com fármaco. Assim, ainda que a suplementação com óleo de peixe em ratos tratados com Dex reduza a contagem de algumas células imunitárias, parece que promoveu melhora na função fagocitária suprimida pelo tratamento isolado com Dex, fato este que pode ser benéfico no caso da utilização crônica deste fármaco. Sugere-se ainda que a implementação de um modelo que apresente exacerbação da resposta inflamatória, mimetizando a utilização real do fármaco, possa apresentar dados complementares sobre os efeitos das duas terapias conjuntas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LITCHMAN, A.H.; PILAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7.ed. Elsevier, 2012. 560p.
- AMAR, M.I; ADAM SHAMA, I.Y; ENAIA, A.A.; HIND, A.E.O; HAGER, A.M. Effects os various levels of oral doses dexamethasona (AI-nagma) abused as cosmetic by sudanese women on wistar rats. **J. Med. Sci.**, v.13, n.6, p.432-438, 2013.
- ANTAL, P.; et al. Flow cytometric assay of phagocytic activity of human neutrophils and monocytes in whole blood by neutral red uptake. **Ann. Hematol**, v.70, p.259-265, 1995.
- ARNARDOTTIR, H.H.; FREYSDOTTIR, J.; HARDARDOTTIR, I. Dietary fish oil decreases the proportion of classical monocytes in blood in healthy mice but increases their proportion upon induction of inflammation. **J. Nutr.**, n.142, v.4, p.803-808, 2012.
- ATTAKPA, E. et al. Docosahexaenoic acid modulates the expression of T-bet and GATA-3 transcription factors, independently of PPAR alpha, through suppression of MAP kinase activation. **Biochimie**, v.91, p.1359–1365, 2009.
- BARICHELLO, T.; et al. Dexamethasone treatment reverses cognitive impairment but increases brain oxidative stress in rats submitted to pneumococcal meningitis. **Oxi. Med. cell longev.**, p.1-7, 2011.
- BARNES, P.J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.31, n.120, p.76-85, 2010.
- BASOE, CF. Assessment of phagocyte functions by flow cytometry. **Curr. Protoc. Cytom.**, v.21, n.9, p.1-9. 2002.
- BATISTA, MARTINS & VASCONSELOS. Expressão gênica de caspases 3 e 8 em timo e baço de ratas recém-desmamadas e imunossuprimidas por glicocorticoide. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.4, p.457-464, 2005.

- BECKER, J.; GRASSO, R.J. Suppression of phagocytosis by dexamethasone in macrophage cultures: inability of arachidonic acid, indomethacin, and nordihydroguaiaretic acid to reverse the inhibitory response mediated by a steroid-inducible factor. **Int. J. Immunopharmacol.**, v.7, n.6, p.839-847, 1985.
- BELL, R.D.; KHAN, M. Cerebrospinal fluid creatine kinase BB activity: a perspective. **Arch. Neurol**, v.56, p.1327-1328, 1999.
- BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.313-316, 1997.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol. Immunol.**, v.40, p.845-859, 2004.
- BONILLA, F.A.; OETTGEN, H.C. Adaptive immunity. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v.125, n.2, p.S33-S40, 2010.
- BOUAYED, J.; BOHN, T. Dietary Derived Antioxidants: Implications on Health. **Nutrition, Well-Being and Health**, p.1-22, 2012.
- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method of quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.
- BULBULL, M.; TAN, R.; GEMICI, B.; HACROGLU, G. AGAR, A.; IZGUT-UYSAL, N. Effect of docosahexaenoic acid on macrophage functions of rats. **Immunobiology**, v.212, p.583-587, 2007.
- BUTTERFIELD, D.A.; et al. Oxidative induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: relevance to Alzheimer's disease. **J. Neurochem.**, v.68, n. 2, p.451-457, 1997.
- CALDER, P.C. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 55, p.737-774, 1996.
- CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Biochem. Society Transactions**, v.33, n. 2, p. 424-427, 2005.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. **Biochimie**, v 91, p.791-795, 2009.

CALDER, P.C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acid. **J. Nutr.**, v. 142, n.3, p. 592S-599S, 2012.

CALDER, P.C. Long chain fatty acids and gene expression in inflammation and immunity. **Curr. Opinion**, v.16, n.4, p.425-433, 2013.

CHAPLIN, D.D. Overview of the immune response. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v.125, n.2, p.S3-S23, 2010.

CLARK, A.R.; BELVISI, M.G. Maps and legends: The quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. **Pharmacol. Ther.**, v.134, p.54-67, 2012.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic annd reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann. Med.**, v. 111, p. 918-931, 1989.

CONNOLLY, K.M.; STECHER, V.J.; LABRIE, T.; FLUNO, C. Modulation of the acute phase response and in vitro measurement of interleukin-1 activity following administration of dexamethasone to adjuvant-arthritic rats. **Immunopharmacology**, v. 15, p.133-142, 1988.

CORRÊA, C.R, et al. Comparação entre a relação PCR/albumina e o índice prognóstico inflamatório nutricional (IPIN). **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.38, n.3, p.183-190, 2002.

CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 1255-1268, 2000.

CZOCK, D. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. **Clin. Pharmacokinet**, v. 44, p.61-98, 2005.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **J. Cell. Mol. Med.**, v.10, p.389-406, 2006.

DALLE-DONNE, A., et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. **Mass. Spectrom. Rev.**, v.24, p.55–99, 2005.

DE BOSSCHER, K.; BECK, I.M.; HAEGEMAN, G. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system? **Brain Behav. Immun.**, v.24, n.7, p.1035-1042, 2010.

DON, B.R.; KAYSEN, G. Serum Albumin: Relationship to Inflammation and Nutrition. **Semin. Dial**, v.17, n.6, p.432-437, 2004.

DU CLOS, T.W. Function of C-reactive protein. **Ann. Med.**, v.32, P.274–278, 2000.

DURACKOVA, Z. Oxidants, antioxidants and redox stress. In: **The Activity of Natural Compounds in Diseases Prevention and Therapy**, p.11–59, Slovakia, 2007

DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiol. Res.**, v.59, n.4, p.459–469, 2010.

ENDRES, S. et al. The effects of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, p.265-271, 1989.

FAPPI, A.; et al. The Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy. **Biomed. Res. Int**, 2014.

FARKAS, E.; WILDE, M.C.; KILIAAN, A.J.; LUITEN, P.G. Systemic effects of dietary n-3 PUFA supplementation accompany changes of CNS parameters in cerebral hypoperfusion. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.977, p.77-86, 2002.

FAUCI, A.S. Mechanisms of Corticosteroid Action on Lymphocyte Subpopulations: Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. **Immunology**, v.28, n.4, p.669-680, 1975.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FILARETOVA, A.; MOROZOVA, O.; BAGAEVA, T.; PODVIGINA, T. From gastroprotective to proulcerogenic action of glucocorticoids on the gastric mucosa. **J. Physiol.**, v.60, p.79-86, 2009.

FIRUZI, O. et al. Parameters of oxidative stress status in healthy subjects: their correlations and stability after sample collection. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.20, p.139-148, 2006.

FOGEL, I.; AMIR, J.; BAR-ON, E.; HAREL, L. A59: dexamethasone therapy for septic arthritis in children: a follow up study. **Arthritis Rheumatol.**, v.66, p.88, 2014.

FRAWLEY, R.; WHITE JR., K.; BROWN, R.; MUSGROVE, D.; WALKER, N.; GERMOLEC, D. Gene expression alterations in immune system pathways in the thymus after exposure to immunosuppressive chemicals. **Environ. Health Perspect.**, v.119, n.3, p.371-376, 2011.

GARCEK, A.; et al. Effects of parenteral fish oil emulsion (Omegaven) on cutaneous wound healing in rats treated with dexamethasone. **J. Parenter. Enteral Nutr.**, v.31, n.3, p.161-166, 2007.

GIOZZET, V.A.G.; RAFACHO, A.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M. BOSQUEIRO, J.R. Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment in rats. **Metabolism**, v.57, n.5, p.617-624, 2008.

GONZALEZ-FLECHA, B.; REIDES, C.; CUTRIN, J.C.; LLESUI, S.F.; BOVERIS, A. Oxidative stress produced by suprahepatic occlusion and reperfusion. **Hepatology**, v. 18, n.4, p.881-889, 1993.

GRASSO, R.J.; KLEIN, T.W.; BENJAMIN, W.R. Inhibition of yeast phagocytosis and cell spreading by glucocorticoids in cultures of resident murine peritoneal macrophages. **J. Immunopharmacol.**, v.3, n.2, p.171-192, 1981.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v.53, n.1, p.110-118, 2004.

GUI, J. XIONG, F. LI, J. HUANG, G. Effects of acupuncture on Th1, Th2 and cytokines in rats of implantation failure. **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.**, 2012.

GUL, M.; YASMIN, A.; ARAL, M. The levels of cytokines in rats following the use prophylactic agents in vascular graft infection. **Brastisl. Leklisty.**, v.11, n.6, p.316-320, 2010.

GUYRE, P.M.; YEAGER, M.P. MUNK, A. **Glucocorticoid effects on immune responses.** In: DEL REY, A.; CHOUSOS, G.; BESEDOVSKY, H., ed. *Neuro Immune Biology: The Hypothalamus-pituitary-adrenal Axis*. V. 7. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2008. 167p.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr. Rev.**, v.70, n.5, p.257-265, 2012.

HALLIWELL, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. **Biomed J.**, v. 37, n.3, p.99-105, 2014.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, v.142, n.1, p.231-255, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3.ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 936 p.

HARDMAN, W.E. n-3 Fatty Acids and Cancer Therapy. **J. Nutr.**, v.134, p.3427-3430, 2004.

HENSLEY, K.; et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. **J. Neurochem.**, v.65, n.2, p.146-156, 1995.

HIRABARA, S.M. et al. Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. **J. Nutr. Biochem.**, 2012.

HINDS, B.; SANDERS, T.A.B. The effect of increasing levels of dietary fish oil rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on lymphocyte phospholipid fatty acid composition and cell-mediated immunity in the mouse. **Br. J. Nutr.**, v.69, p.423-429, 1993.

HONG, M.Y.; LUMIBAO, J.; PRASHILA, M.; RHONDA, S.; HOH, E. Fish oil contaminated with persistent organic pollutants reduces antioxidant capacity and induces oxidative stress without affecting its capacity to lower lipid concentrations and systemic inflammation in rats. **J. Nutr.**, v.145, n.5, p.939-944, 2015.

IBRAHIM, W.; LEE, U.S.; YEH, C.C.; SZABO, J.; BRUCKNER, G.; CHOW, C.K. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron. **J. Nutr.**, v.127, p.1401-1406, 1997.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidant Redox Signaling**, v. 8, p. 9-10, 2006.

JOVANOVIĆ, P.; et al. Lactate Dehydrogenase and oxidative stress activity in primary open-angle glaucoma aqueous humor. **Bosn. J. Basic Med. Sci.**, v.10, n.1, p.83-88, 2010.

KIKUAGWA, K. YASUHARA, Y.; ANDO, K.; KOYAMA, K. HIRAMOTO, K.; SUZUKI, M. Protective effect of supplementation of fish oil with high n-3 polyunsaturated fatty acids against oxidative stress-induced DNA damage of rat liver in vivo. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, n.20, p.6073-6079, 2003.

KLEINER, G; MARCUZZI, A; ZANIN, V; MONASTA, L; ZAULI, G. Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects. **Mediators Inflamm.**, v.2013, p.1-6, 2013.

KO, Y.J.; LII, C.K.; OU, C.C.; LIU, J.Y.; CHEN, H.W. Comparison of the effect of fish oil and corn oil on chemical-induced hepatic enzyme-

altered foci in rats. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, n.9, p.4144-4150, 2000.

KROHN, T.C.; FARLOV, H.; HANSEN, A.K. The Effects of Housing on Food and Water Consumption in Da-Rats. **Scand. J. Lab. Anim. Sci.** v. 38, n. 1, 2011.

LECCHI, C.; INVERNIZZI, G.; AGAZZI, A.; FERRONI, M.; PISANI, L.F.; SAVOINI, G.; CECILIANI, F. In vitro modulation of caprine monocyte immune functions w-3 polyunsaturated fatty acids. **Vet. J.**, v.189, n.3, p.353-355, 2011.

LEE, T.H. et al. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. **N. Engl. J. Med.**, v.312, p.1217-1224, 1985.

LEVINE, R.I.; et al. Determination of carbonyl content in oxidative modified proteins. **Meth. Enzymol.**, v.186, p.464-478, 1990.

LIM, H.Y.; MULLER, N.; HEROLD, M.J.; VAN DEN BRANDT, J.; REICHARDT, H.M. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. **Immunology**, v.122, n.1, p.47-53, 2007.

LINDBERG, L.; FORSELL, C.; JÖGI, P. OLSSON, A.K. Effects of dexamethasone on clinical course, C-reactive protein, S100B protein and von Willebrand factor antigen after pediatric cardiac surgery. **Br. J. Anaesth.**, v.90, n.6, p.728-732, 2003.

LINGAIAH, H.B.; THAMARAISELVAN, R.; PERIYASAMY, B.M. Dexamethasone induced alterations in lipid peroxidation, antioxidants, membrane bound atpase in wistar albino rats. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**, v.4, n.3, p.497-499, 2012.

LOUREIRO, A.P.M; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quim. Nova**, v.25, n.5, p.777-793, 2002.

LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Efeitos do exercício físico crônico sobre as proteínas no diafragma de ratos diabéticos. **Motriz**, v.5, n.2, 1999.

MANJARI, V.; DAS, U.N. Effect of polyunsaturated fatty acids on dexamethasone-induced gastric mucosal damage. **Prostaglandins leukot. Essent. fatty acids**, v.62, n.2, p.85-96, 2000.

MARANZANO, E. et al. Evidencebased recommendations for the use of antiemetics in radiotherapy. **Radiother. Oncol.**, v.76, p.227-233, 2005.

MARNELL, L.; MOLD, C.; DU CLOS, T.W. C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. **Clin. Immunol.**, v.117, n.2, p.104–111, 2005.

MAYER, G. Chapter one Innate (non-specific) immunity. In: Microbiology and Immunology On-line. Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/innate.htm>. Acesso em 5 abril 2014.

MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 108, p. 652-659, 2000.

MCGUIRE, S.O.; ALEXANDER, D.W.; FRITSCHE, K.L. Fish oil source differentially affects rat immune cell alpha-tocopherol concentration. **J. Nutr.**, n.127, p.1388–1394, 1997.

MÉNDEZ-ARMENTA, M.; VILLEDA-HERNÁNDEZ, J.; BARROSO-MOGUEL, R.; NAVA-RUÍZ, C.; JIMÉNEZ-CAPDEVILLE, M.E.; RÍOS, C. Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. **Toxicol. Lett.**, v.144, p.151-157, 2003.

MEYDANI, S. N. Effects of (n-3) polyunsaturated fatty acids on cytokine production and their biologic function. **Nutrition**, v.12, p.8-14, 1993.

MILES, E.A.; CALDER, P.C. Modulation of immune function by dietary fatty acids. **Proc. Nutr. Soc.**, v.57, p.277–292, 1998.

MIRET, S.; SÁIZ, M.P.; MITJAVILA, M.T. Effects of fish oil- and olive oil-rich diets on iron metabolism and oxidative stress in the rat. **Br. J. Nutr.**, v.89, n.1, p.11-8, 2003.

MLAMBO, G.; SIGOLA, L.B. Rifampicin and dexamethasone have similar effects on macrophage phagocytosis of zymosan, but differ in their effects on nitrite and TNF-alpha production. **Int. Immunopharmacol.**, v.3, n.4, p.513-522, 2003.

MORENO, J.J.; CABONELL, T.; SÁNCHEZ, T.; MIRET, S.; MITJAVILA, M.T. Olive oil decreases both oxidative stress and the production of arachidonic acid metabolites by the prostaglandin G/H synthase pathway in rat macrophages. **J. Nutr.**, v.131, n.8, p.2145-2149, 2003.

MUKARO, V.R.; COSTABILE, M.; MURPHY, K.J.; HIL, C.S.; HOWE, P.R.; FERRANTE, A. Leukocyte numbers and function in subjectseating n-3 enrichedfoods: selectivedepressionof natural killer cell levels. **Arthritis Res. Ther.**, v.10, n.3, 2008.

NAGATOMI, R. The implication of alterations in leukocyte subset counts on immune function. **Exerc. Immunol.** v.12, p.54-71, 2006.

NAKAMURA, Y.; MURAI, T.; OGAWA, Y. Effect of in vitro and in vivo administration of dexamethasone on rat macrophage functions: comparison between alveolar and peritoneal macrophages. **Eur. Respir. J.**, v.9, n.2, p.301-306, 1996.

NAKAO, R.; YAMAMOTO, S.; YASUMOTO, Y.; OISHI, K. Dosing schedule-dependent attenuation of dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. **Chronobiol Int.**, v.31, n.4, p.506-514, 2014.

NAWA, K.; NAKAMURA, T.; KUMATORI, A.; NODA, C.; ICHIHARA, A.; Glucocorticoid-dependent expression of the albumin gene in adult rat hepatocytes. **J. Biol. Chem.**, v.261, n.36, p.16883-16888, 1986.

NIBY, M.D. et al. Dietary Fish Oil Prevents Vascular Dysfunction and Oxidative Stress in Hyperinsulinemic Rats. **Am. J. Hypertens.**, v.18, n.2, 2005.

NIELSEN, F.H. Dietary fatty acid composition alters magnesium metabolism, distribution, and marginal deficiency response in rats. **Magnes. Res.**, v.22, n.4, p.280-288, 2009.

NISHIGORI H.; LEE, J.W.; YAMAUCHI, Y.; IWATSURU, M. Elevation of blood lipid peroxides [TBA- reacting substance] level in developing chick embryo after glucocorticoid administration. **Biochem. Int.**, v.13, p.47-183, 1986.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Anal. Biochem.**, v.220, n.2, p.403-409, 1994.

NORBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free. Radic. Biol. Med**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

NUNES, E.A. et al. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ methylbutyrate in rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab**, v.38, p.1137-1146, 2013.

NUSSE, O. Biochemistry of the Phagosome: The Challenge to Study a Transient Organelle; **The Scientific World Journal**, v.11, p.2364-2381, 2011.

OHKARU, Y.; et al. Acute and subacute effects of dexamethasone on the number of white blood cells ai rats. **J. Health. Sci.**, v.56, n.2, p.215-220, 2010.

OTTERNESS, I.G.; PAZOLES, P.P.; MOORE, P.F.; PEPYS, M.B. C-reactive protein as an index of disease activity. Comparison of tenidap, cyclophosphamide and dexamethasone in rat adjuvant arthritis. **J. Rheumatol.**, v.18, n.4, p.505-11, 1991.

ORZECZOWSKI, A.; et al. Excess of glucocorticoids impairs whole-body antioxidant status in young rats. Relation to the effect of dexamethasone in soleus muscle and spleen. **Horm. Metab. Res.**, v.32, n.5, p.174-180, 2000.

ORZECZOWSKI, A. OSTASZEWSKI, P.; WILCZAK, J.; BALASINSKA, B.; WARESKI, P. FULLER, J. JR. Rats with a glucocorticoid-induced catabolic state show symptoms of oxidative stress and spleen atrophy: the effects of age and recovery. **J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v.49, n.5, p.256-263, 2002.

PAPAHARALAMBUS, C.A.; GRIENDLING, K.K. Basic mechanism of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. **Trends Cardiovas. Med.**, v.17, p.48-54, 2007.

PASCHOAL, V.A.; VINOLO, M.A.; CRISMA, A.R.; MAGDALON, J.; CURI, R. Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid differentially modulate rat neutrophil function in vitro. **Lipids**, v.48, n.3, p.93-103, 2013.

PASCUAL, G.; GLASS, C.K. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends Endocrinol. Meta.**, v.7, n.8, p.321-327, 2006.

PERANDONES, C.E.; ILLERA, V.A.; PECKHAM, D.; STUNTZ, L.L.; AHSMAN, R.F. Regulation of apoptosis in vitro in mature murine spleen T cells. **J. Immunol.**, v.151, n.7, p.3521-3529, 1993.

PISANI, L.F.; LECCHI, C.; INVERNIZZI, G.; SARTORELLI, P.; SAVOINI, G.; CECILIANI, F. In vitro modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) on phagocytosis and ROS production of goat neutrophils. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.15, n.1-2, p.79-85, 2009.

POMPÉIA, C.; LOPES, L.R.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J.; SANNOMIYA, P.; CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 1255-1268, 2000.

RABBANI, P.I.; ALAM, H.Z.; CHIRTEL, S.J.; DUVALL, R.E.; JACKSON, R.C.; RUFFIN, G. Subchronic toxicity of fish oil concentrates in male and female rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, n.47, v.3, p.201-212, 2001.

RABBANI, P.I.; SHEIKH, N.M. CHIRTEL, S.J.; JACKSON, R.; RUFFIN, G. Effects of long-term consumption of high doses of fish oil

concentrates on clinical parameters in male and female rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.45, n.5, p.553-565, 1999.

RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v.36, p.284–293, 2008a

RAHAL, A.; et al. Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay. **Biomed. Res. Int.**, p.1-19, 2014.

RAJASHREE, S.; PUVANAKRISHNAN, R. Dexamethasone induced alterations in enzymatic and nonenzymatic antioxidant status in heart and kidney of rats. **Mol. Cell. Biochem.**, v.181, p.77-85, 1998.

RAMAN, D; SOBOLIK-DELMARE, T; RICHMOND, A. Chemokines in health and disease. **Experimental Cell Research**, v. 317, n.5, p.575–589, 2011.

RAY, P.D.; HUANG, B.W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal.**, v. 24, n.5, 2012.

REPETO, G; DEL PESO, A; ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for stimulation of cell viability/cytotoxicity. **Nat. Protoc.**, v.3, n.7, p.1125-1131, 2008.

RENIER, G.; SKAMENE, E.; DESANCTIS, J.; RADZIOCH, D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. Modulation of macrophage secretory activities. **Arterioscler. Thromb.**, n.13, v.10, p.1515-1524, 1993.

RODRÍGUEZ, M.C.; SAIZ, M.P.; MUNTANE, J.; MITJAVILA, M.T. Fatty acid composition of erythrocyte membranes affects iron absorption in rats. **J. Nutr.**, n.126, p.3109–3117, 1996.

SAKLATVALA, J. Glucocorticoids: do we know how they work? **Arthritis Res.**, v.4, p.146-150, 2002.

SALAMA, A.A.; ZAKI, H.F.; EL-SHENAWY, S.M.; EL-DENSHARY, E.S. ISMAIEL, I.E.; SHAFFIE, N.M. Effects of fish oil and

dexamethasone in experimentally-induced bronchial asthma. **Aust. J. Basic Appl. Sci.**, v.6, n.13, p.497-506, 2012.

SALIH, H.R.; HUSFELD, L. ADAM, D. Simultaneous cytofluorometric measurement of phagocytosis, burst production and killing of human phagocytes using *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* as target organisms. **Clin. Microbiol. Infect.**, n. 6, v.5, p.251-258, 2000.

SANDERSON, P.; YAQOOP, P.; CALDER, P.C. Effects of dietary manipulation upon rats spleen lymphocyte functions and the expression of lymphocyte surfacemolecules. **J. Nutr. Environ. Med.**, v.5, p.119-132, 1997.

SANTOS, C.L.; RAFACHO, A.; BOSCHERO, J.R. Efeitos da administração de dexametasona in vivo sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Biosci. J.**, v.23, n.3, p.101-110, 2007.

SCHÄCKE, H.; DOCKE, W.D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol. Ther.**, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**, v.10, n.10, p.308-13, 2004.

SEIFRIED, H. E. et al. A review of the interaction among dietary Journal of Nutritional antioxidants and reactive oxygen species. **Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567-579, 2007.

SERHAN, C.N. Novel chemical mediators in the resolution of inflammation: resolvins and protectins. **Anesthesiol. Clin.**, v.24, n. 2, p.341-64, 2006.

SMINK, J.J.; GRESNIGT, M.G.; HAMERS, N.; KOEDAM, R.; BERGER, R. Short-term glucocorticoid treatment of prepubertal mice decreases growth and IGF-I expression in the growth plate. **J. Endocrinol.**, v.177, p.381-388, 2003.

SOKOLOVSKA, A.; BECKER, C.E.; STUART, L.M. Measurement of phagocytosis, phagosome, acidification, and intracellular killing of

staphylococcus aureus. **Curr. Protoc. Immunol.**, v.9, n.14, p.1-14, 2012.

SOMPAYRAC, L. **How the immune system works**. 4.ed. West Sussex: John, Wiley & Sons, 2012. 152p.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein Oxidation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 899, p. 191-208, 2000.

SUGIHARA, N; TSURUTA, Y.; DATE, Y.; FURUNO, K.; KOHASHI, K. High peroxidative susceptibility of fish oil polyunsaturated fatty acid in cultured rat hepatocytes. **Toxicol. Appl. Pharm.**, v.126, n.1, p.124-128, 1994

TAKÁCS, T.; FARKAS, G.; CZAKÓ, L.; JÁRMAY, K.; MÁNDI, Y.; LONOVICS, J. Time-course changes in serum cytokine levels in two experimental acute pancreatitis models in rats. **Res.Exp.Med. (Berl)**., v.196, n.3, p.153-161, 1996.

THOMAS, J.P.; MAIORINO, M.; URSINI, F.; GIROTTI, A.W. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. **J. Biol. Chem.**, n.265, p.454-461, 1990.

THUNHORST, R.L.; BELTZ, T.G.; JOHNSON, A.K. Glucocorticoids increase salt appetite by promoting water and sodium excretion. **Am. J. Physiol. Regul. Integ. Comp. Physiol.**, v. 293, n.3, 2007.

TOMAZI, L.; MARAFON, F.; CHIELLI, E.O. Avaliação da proteína C reativa em ratos diabéticos tratados com rutina. **Unoesc & Ciência**, v.4, n.1, p.49-58, 2013.

TURVEY, S.; BROIDE, D.H. Innate immunity. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v.125, n.2, P.S24-S.32, 2010.

TRETTER, L.; ADAM-VIZI, V. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. **Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 8972-8979, 2000.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN DEN BERGHE, W.; VERMEULEN, L.; DELERIVE, P. A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. **Adv. Med. Biol.**, v.544, p.181-196, 2003.

VAN RAALTE, D.H.; OUWENS, D.M.; DIAMANT, M. Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? **Eur. J. Clin. Invest.**, v.39, n.2, p.81-93, 2009.

VARNEY, M.E; HARDMAN, W.E.; SOLLARS, V.E. Omega 3 fatty acids reduce myeloid progenitor cell frequency in the bone marrow of mice and promote progenitor cell differentiation. **Lipids Health Dis.**, p.8-9, 2009.

VENKATARAMAN, P.; KRISHNAMOORTHY, G.; SELVAKUMAR, K.; ARUNAKARAN, J. Oxidative stress alters creatine kinase system in serum and brain regions of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254)-exposed rats: protective role of melatonin. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v.105, n.2, p.92-97, 2009.

VERHOEF, C.M.; VAN ROON, J.A.; VIANEN, M.E.; LAFEBER, F.P.; BIJLSMA, J.W. The immune suppressive effect of dexamethasone in rheumatoid arthritis is accompanied by upregulation of interleukin 10 and by differential changes in interferon gamma and interleukin 4 production. **Ann. Rheum. Dis.**, v.58, n.1, p.49-54, 1999.

WANG, A. et al. Effect of bizhongxiaodecotion (bxzd) on some cytokines in plasma of rats with cii-induced rheumatoid arthritis. **Int. J. Biomed. Sci.**, v.1, n.1, p.53-56, 2005.

WINKLER, J. Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red. **Prog. Histochem. Cytochem.**, v.3, n.6, p.1-91, 1974.

WINKELSTEIN A. **Immunosuppressive therapy.** In: Basic and Clinical Immunology. 7.ed. Norwalk: Appleton and Lange, 1991. p.766-779.

WONG, M.M; FISH, E.N. Chemokines: attractive mediators of the immune response. **Sem. Immunol.**, v.15, n.1, p.5–14, 2003.

YAMAZAKI, R.K. et al. Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 66, 2011.

YILMAZ, H.R.; SONGUR, A.; OZYURT, B.; ZARARSIZ, I.; SARSILMAZ, M. The effects of n-3 polyunsaturated fatty acids by gavage on some metabolic enzymes of rat liver. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.**, v.71, n.2, p.131-135, 2004.

YOSHIDA, Y.; ITO, N.; SHIMAKAWA, S.; NIKI, E. Susceptibility of plasma lipids to peroxidation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.305, n.3, p.747-753, 2003.

YOSHIMURA, C.; et al. Glucocorticoids induce basophil apoptosis. **J. Allergy Clin. Immun.**, v.108, p.215-220, 2001.

## APÊNDICE A: NOTA À IMPRENSA

### **Estudo mostra possível benefício da suplementação de óleo de peixe sobre função do sistema imunológico suprimida pelo tratamento com glicocorticoide em ratos**

A pesquisa de Mestrado de Luiza Kuhnen Teixeira, com orientação do Professor Dr. Everson Araújo Nunes, realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina, avaliou os efeitos da suplementação de óleo de peixe sobre parâmetros relacionados ao sistema imunológico e ao estresse oxidativo em ratos imunossuprimidos pelo tratamento com o glicocorticoide dexametasona. Os pesquisadores observaram que a suplementação com óleo de peixe promoveu uma melhora significativa na função fagocitária de células do sistema imunológico no sangue de ratos, a qual foi suprimida pelo tratamento prolongado e com alta dose de dexametasona.

Os glicocorticoides, fármacos utilizados para tratar processos inflamatórios acentuados, promovem supressão do processo de fagocitose em humanos e ratos, função esta responsável pela defesa imunológica do organismo, o que pode os deixar susceptíveis a infecções oportunistas quando usados por períodos prolongados. Em algumas situações clínicas, como no tratamento da artrite reumatoide, do câncer e após transplante de órgãos e tecidos por exemplo, os glicocorticoides podem ser utilizados de forma concomitante ao óleo de peixe, já que à este suplemento são atribuídos efeitos anti-inflamatórios e reguladores do sistema imunológico; na situação de uso simultâneo ao óleo de peixe pode trazer benefício à uma das funções de defesa imunológica prejudicada pelo uso do fármaco, protegendo o organismo contra infecções oportunistas.

Apesar dos resultados promissores, os animais utilizados no estudo não apresentavam nenhuma patologia, diferente das situações clínicas em que se observa o uso do óleo de peixe simultâneo ao uso do glicocorticoide em humanos. Assim, esta pesquisa abre as portas para novas investigações ao respeito do efeito da suplementação de óleo de peixe sobre a função imunológica de animais com patologias tratados com glicocorticoides, para posteriormente propiciar essa avaliação em seres humanos, podendo contribuir para o tratamento clínico de inúmeras doenças.

Ademais, esta pesquisa contribui para o conhecimento sobre a interação entre o óleo de peixe e fármacos, que são comumente utilizados de forma simultânea, prescritos ou não por profissionais da saúde, e que podem influenciar positivamente ou negativamente em funções importantes do organismo.

Este estudo foi desenvolvido pelo Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas da Universidade Federal de Santa Catarina, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## ANEXO A: Aprovação pelo Comitê de Ético do Uso de Animais (CEUA) da UFSC

<http://notes.ufsc.br/optico/ceua.nsf/481c2b91e9931c968325702e0075533>

### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**

PRO0702

**Título**

MÉTODOS/LOCOMAS UTILIZADAS NO LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS CRÔNICAS – LIDOC / ABORDAGENS ENDÓCRINAS E METABÓLICAS

**Data de Entrada**

07/03/2012

**Resultado**

Aprovado

**Data/Prazo**

01/05/2012

**Considerações**

Ofício nº 47/CEUA/PRPE/2011

De: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

At(a): Prof(a) Dra(a) Alex Rufacho, Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer final estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: quinhentos camundongos (*Mus musculus*) e quinhentos ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**

**Data 05/09/2016**

Data 01/06/2012

**Parecer(es):**



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE

