UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

HEPATOLOGIA

João Bruno Beretta de Almeida Duailibe

Efeito protetor dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 na Síndrome Hepatorrenal em ratos Wistar.

Porto Alegre

2024

João Bruno Beretta de Almeida Duailibe

Efeito protetor dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 na Síndrome Hepatorrenal em ratos Wistar.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina – Hepatologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profª. Drª. Marilene Porawski

Porto Alegre 2024

Catalogação na Publicação

Beretta de Almeida Duailibe, João Bruno
EFEITO PROTETOR DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA 3 NA SÍNDROME HEPATORENAL EM RATOS WISTAR. / João Bruno Beretta de Almeida Duailibe. -- 2024.
60 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia, 2024.

Orientador(a): Marilene Porawski.

1. Síndrome Hepatorrenal. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Efeito protetor dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 na Síndrome Hepatorrenal em ratos Wistar.

BANCA AVALIADORA

Dr. Ângelo Alves de Matos
Programa de Pós Graduação em Medicina: Hepatologia
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dra. Fernanda Bordignon Nunes
Departamento de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dr. Luciano Sturmer de Fraga
Departamento de Fisiologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTO

Agradeço à minha orientadora, Drª. Marilene Porawski Garrido, por confiar em mim, por toda atenção, por dividir comigo seus conhecimentos e incentivar-me à pesquisa.

À minha família que sempre acreditou em mim, por todo apoio, amor e dedicação. Obrigado por tudo!

Aos colegas e professores do programa de pós-graduação Medicina – Hepatologia da UFCSPA pelos conhecimentos compartilhados.

“Nunca diga nunca, porque os limites, como os medos, são muitas vezes apenas uma ilusão” (Michael Jordan).

RESUMO

Introdução: A síndrome hepatorrenal (SHR) é um dos tipos mais comuns de lesão renal aguda (LRA) que afeta doentes cirróticos e caracteriza-se pela redução do fluxo sanguíneo renal, não correspondendo à expansão do volume, e é uma das complicações mais graves que afetam os pacientes cirróticos com doença avançada. **Objetivo:** Estudar o efeito protetor da suplementação de ácidos graxos do tipo ômega-3 no tecido renal de ratos cirróticos. **Métodos:** Trata-se de uma pesquisa experimental em ratos Wistar com revisão da literatura. Para o experimento, foram utilizados 24 ratos Wistar machos divididos nos seguintes grupos: Grupo I (controle); Grupo II (tratado com ômega-3, 1g/kg de peso corporal); Grupo III (LDB tratado com ômega-3, 1g/kg de peso corporal) e Grupo IV (LDB sem tratamento). O ômega-3 utilizado foi da marca Catarinense. A cirrose hepática foi induzida pelo modelo de ligadura do duto biliar (LDB) com duração de 28 dias. Após o período de experimento, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico. Os rins foram dissecados, retirados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80ºC para posterior análise. Foram avaliados o estresse oxidativo, os metabólitos do óxido nítrico, o dano ao DNA pelo ensaio cometa, o teste de viabilidade celular e a presença de apoptose no tecido renal. Os dados foram estatisticamente aferidos por análise de variância unidirecional (ANOVA), e as médias foram comparadas usando o teste Tukey, com $p \leq 0,05$ considerado como estatisticamente significativo usando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (Intuitive Software for Science, São Diego, CA, EUA). **Resultados**: O ômega-3 diminuiu significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ($p < 0,001$) e a formação de malondialdeído (MDA) no grupo LDB + ômega-3 ($p < 0,001$). A atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT aumentou no grupo LDB + ômega em relação ao grupo LDB ($p < 0,01$). A produção de óxido nítrico, o dano ao DNA e a caspase 9 foram significativamente diminuídas no grupo LDB tratado com ômega-3 e houve um aumento do potencial eletroquímico mitocondrial ($p < 0,001$) no grupo LDB tratado com ômega-3 em relação ao grupo LDB. Não foram observadas alterações no índice de sobrevivência celular na síndrome hepatorrenal com ômega-3 quando comparadas ao grupo controle ($p > 0,05$). **Conclusões:** O estudo mostra que o ômega-3 é capaz de proteger a integridade e função celular do dano oxidativo através do aumento das enzimas antioxidantes, inibição da formação de radicais livres e diminuição da apoptose.

Palavras-chave: Ácido graxo poli-insataurado ômega-3, Síndrome hepatorrenal, Espécies reativas de oxigênio, Apoptose

ABSTRACT

Introduction: Hepatorenal syndrome (HRS), is one of the most common types of acute kidney injury (AKI) affecting cirrhotic patients and is characterized by the depletion of renal blood flow, not corresponding to volume expansion, and is one of the most serious complications affecting cirrhotic patients with advanced disease. Objective: The main purpose of the study was to highlight the potential therapeutic effects of omega-3 fatty acid supplementation on the renal tissue of cirrhotic rats. Methods: This is experimental research in Wistar rats with literature review. For the experiment, 24 male Wistar rats divided into the following groups were used: Group I (control); Group II (treated with omega-3, 1g/kg body weight); Group III (LDB treated with omega-3, 1g/kg body weight) and Group IV (LDB without treatment). The omega-3 used was Catarinense brand. Liver cirrhosis was induced by the 28-day bile duct ligation (LDB) model. After the experimental period, the animals were euthanized by overdose of anesthetic, the kidneys were dissected, removed and frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80°C for further analysis. Oxidative stress, nitric oxide metabolites, comet assay, cell viability test, and apoptosis evaluation in kidney tissue were evaluated. Data were statistically gauged by one-way analysis of variance (ANOVA), and means were compared using the Tukey test, with $p \leq 0.05$ considered as statistically significant using GraphPad Prism version 5.0 software (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, USA). Results: Omega-3 significantly decreased the production of reactive oxygen species (ROS) ($p < 0.001$) and the formation of malondialdehyde (MDA) in the LDB + omega-3 group ($p < 0.001$). The activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT increased in the LDB + omega group compared to the LDB group ($p < 0.01$). Nitric oxide production, DNA damage and caspase 9 were significantly decreased in the LDB group treated with omega-3 and there was an increase in mitochondrial electrochemical potential ($p < 0.001$) in the LDB group treated with ômega-3 compared to the LDB group. No changes were observed in the cell survival index in the hepatorenal syndrome with omega-3 when compared to the control group ($p > 0.05$). Conclusions: The study shows that Omega-3 is able to protect cell integrity and function from oxidative damage by increasing antioxidant enzymes, inhibiting free radical formation and decreasing apoptosis.

Keywords: ômega-3 polyunsaturated acid, Hepatorenal syndrome, Reactive oxygen species and Apoptosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AL	Ácido Linoleico
ALA	Ácido Linolênico
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
BD	Bilirrubina Direta
BT	Bilirrubina Total
Child-Pugh	Classificação de Child-Turcotte-Pugh
DHA	Ácido Docosa-hexaenóico
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Escala MELD (do inglês: Model for End-stage Liver Disease)	Modelo para doença hepática terminal
FA	Fosfatase Alcalina
GGT	Gama Glutamil Transferase
ICA	International Club of Ascites – Clube internacional de Ascite
LDB	Ligadura do Ducto Biliar Comum
LRA	Lesão Renal Aguda
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Proteína C-reativa
pH	Potencial de Hidrogênio
AGPIs	Ácidos Graxos Poli-insaturados
SHR	Síndrome Hepatorrenal
TAA	Tiocetamida
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
UCI	Unidades de Cuidados Intensivos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

A cirrose é uma doença hepática crônica que provoca inflamação e fibrose no fígado, bem como induz alterações anatômicas e estruturais. Com o avanço da doença, ocorre uma série de eventos, como o desenvolvimento da hipertensão portal, ascite, varizes gastroesofágicas, dentre outros (1, 2 ,3).

A hipertensão portal (HP) é causada pelo aumento da resistência do fluxo sanguíneo no fígado cirrótico. As alterações hemodinâmicas dessa complicação levam ao surgimento da síndrome hepatorrenal (SHR), uma das formas de lesão aguda renal que afeta principalmente doentes portadores de cirrose em estágios avançados da doença (1, 2).

A SHR é caracterizada por uma vasoconstrição renal acentuada causada pela insuficiência circulatória sistêmica proveniente da cirrose devido ao fígado estar enrijecido e não permitir a irrigação sanguínea de forma efetiva; no entanto, a doença em estágios iniciais é unicamente funcional por não apresentar danos estruturais no rim. O tratamento da SHR baseia-se principalmente na utilização conjunta de vasoconstritores e albumina; porém, o transplante hepático é o único tratamento capaz de reverter o quadro de insuficiência renal (1, 2, 4).

Desta feita, é oportuna a busca por novas substâncias que possam atuar de forma colaborativa no tratamento da SHR. E nesse passo os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 têm sido foco de diversas pesquisas científicas nas últimas décadas devido ao seu potencial anti-inflamatório desempenhado frente a diversas doenças (5, 6, 7).

O presente estudo tem como objetivo investigar os benefícios da suplementação de ômega-3 em ratos portadores de SHR.

2 REVISÃO DE LITERATURA – CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 CIRROSE

A cirrose hepática é oriunda de diversos eventos causais, desde a hepatotoxicidade induzida por drogas, infecções por hepatites, consumo excessivo de álcool, doenças metabólicas primárias e doenças que afetam o trato biliar. No percurso da doença ocorre a destruição contínua dos hepatócitos e a deposição de colágeno, o que confere ao fígado um encolhimento, alterações anatômicas e funcionais, tais alterações dificultam a circulação sanguínea intra-hepática.

Com o avanço e agravamento da doença, uma série de eventos decorrentes da alteração hepática acontece. Dentre estes eventos, destacam-se a hipertensão portal, varizes gastroesofágicas, ascite, encefalopatia hepática, depleção da síntese de fatores de coagulação e síndrome hepatorrenal (8).

A cirrose pode ser classificada como compensada quando o indivíduo possui o diagnóstico da doença; no entanto, não apresenta sintomatologia. A cirrose descompensada é quando há a presença de complicações decorrentes doença, como ascite, encefalopatia hepática e sangramento das varizes gastroesofágicas. A dinâmica entre as classificações está intimamente relacionada com o agravo da hipertensão portal, ou seja, com a piora da HP, pode haver a descompensação da cirrose (9,1,10 8).

O diagnóstico da cirrose baseia-se na combinação de diversos métodos diagnósticos, tanto invasivos como conservadores. O exame morfológico através da biópsia hepática continua sendo o padrão ouro para diagnóstico da doença. No entanto, outros métodos não-invasivos costumam ser utilizados, como análises bioquímicas, avaliação da rigidez tecidual através de elastografia e demais exames complementares de imagem. Diante do exposto, a terapêutica que confere a cura ao paciente cirrótico é o transplante do órgão. Em relação ao prognóstico, o mesmo está intimamente relacionado com vários fatores, como a fase da doença, a etiologia, a presença de doenças subjacentes e outras complicações (11,9).

Além disso, no Brasil, para a avaliação, monitorização da progressão da doença e dos seus parâmetros, bem como a priorização nas listas de espera para transplante hepático, são utilizados os protocolos Child-Pugh e MELD (do inglês

Model for End Stage Liver Disease), ambos avaliam o grau de comprometimento do fígado e o prognóstico dos pacientes com cirrose hepática (12).

Em relação às terapêuticas aplicadas ao manejo das hepatopatias, recentemente tem surgido o interesse de pesquisadores por estudos relacionados a substâncias que possam atuar de forma coadjuvante no tratamento das doenças hepáticas. Neste sentido, dentre as diversas substâncias já estudadas, é importante destacar o uso da melatonina como alternativa para a melhora do dano hepático (13), assim como de produtos naturais como o própolis vermelho (14), a rutina (15) e a quercetina (16).

2.2 HIPERTENSÃO PORTAL

A hipertensão portal (HP) é considerada uma síndrome clínica caracterizada pelo aumento da pressão da veia porta e entre as causas mais comuns está a cirrose hepática (17). Os valores normais de pressão portal estão entre 1 e 5 mmHg (gradiente de pressão portal), valores acima de 5 indicam HP. No entanto, valores entre 5 e 10 mmHg, mesmo que seja hipertensão portal, são considerados clinicamente não preocupantes, enquanto que valores acima de 10 mmHg são clinicamente perigosos, uma vez que existe risco elevado de desenvolvimento de varizes gastroesofágicas (18,19).

A HP é causada por uma obstrução do fluxo sanguíneo portal que pode ocorrer em diferentes regiões do sistema venoso portal e, de acordo com a região de obstrução, a classificação da doença é realizada, portanto:

- **Pré-hepática**: se a obstrução ocorrer na veia esplênica, veia porta ou veia mesentérica, ou seja, antes do fígado;
- **Intra-hepática**: se a obstrução ocorrer no fígado;
- **Pós-hepática**: se a obstrução envolver a saída venosa hepática, ou seja, após o fígado (20).

Quando a obstrução ocorre dentro do fígado (intra-hepática), há uma subclassificação que ocorre de acordo com o local da obstrução intra-hepática, como pré-sinusoidal, que são geralmente as obstruções decorrentes de casos de

esquistossomose; sinusoidal que classifica a obstrução decorrente da cirrose, ou pós-sinusoidal que classifica as obstruções decorrentes de doenças que afetam a veia central (20).

Em relação ao diagnóstico de HP, este é preferencialmente realizado pelo método de medição da pressão portal, amplamente conhecido como um método de diagnóstico direto, que é feito através de pontos de referência internos, com a pressão da veia cava inferior, determinando um gradiente de pressão venosa portal em conjunto com exames complementares como a endoscopia digestiva superior e testes de imagem (21).

A cirrose hepática é a principal causa compreendendo mais de 90% dos casos de hipertensão portal. Entre as principais complicações resultantes da HP estão a hemorragia digestiva superior devido à ruptura das varizes gastroesofágicas. Outra complicação não menos importante é a presença de ascite (21,22).

A ascite no paciente cirrótico é ocasionada por uma série de eventos bioquímicos, estruturais e circulatórios. Neste sentido, a ascite é definida como o acúmulo de líquido na cavidade abdominal. Nos pacientes cirróticos, a presença de ascite é vista como um sinal pioneiro da doença, impactando diretamente a qualidade de vida do paciente. No paciente em que o volume de líquido retido na região peritoneal ultrapassa 1500 ml, o abdômen apresenta aspecto globoso, estiramento da região e dificuldades ventilatórias, bem como a presença de edema de membros.

Existem três teorias aceitas, as quais tentam elucidar a fisiopatologia da ascite. A teoria da vasodilatação explica que na fase inicial da cirrose há a presença de vasodilatação periférica e retenção de água e sódio pelos rins. Já na fase intermediária da doença, há a teoria *overflow* (super-fluxo), onde ocorre o escape dos fluídos para a cavidade peritoneal, após meses com a presença de ascite e agravamento da cirrose. A teoria *underfill* (baixo-enchimento) caracteriza a queda do volume efetivo circulante e a ativação dos sistemas vasopressores, ocasionando a retenção de água e sódio pelos rins (21,23).

Por outro lado, com o aumento da resistência vascular intra-hepática e o consequente aumento da pressão portal, há o desenvolvimento de comunicações entre a veia porta e a circulação sistêmica com o intuito de descongestionar o fluxo sanguíneo na região portal e manter o retorno sanguíneo ao coração. Essas

comunicações são denominadas *shunts* ou colaterais portossistêmicos. No entanto, tal medida fisiológica é pouco efetiva, uma vez que não ocasiona a diminuição de forma efetiva da HP. Os *shunts* portossistêmicos podem ser classificados em esquerdos e direitos (centrais). O *shunt* direto mais frequente é o paraumbilical, enquanto os *shunts* esquerdos mais comuns são *shunt* gastrorrenal e esplenorrenal (24).

O *shunt* gastrorrenal acomete em média de 80 a 85% dos pacientes cirróticos com presença de varizes gástricas. Este *shunt* forma uma ligação entre a veia gástrica e a veia renal esquerda. A presença de *shunts* em pacientes cirróticos é aumentada de acordo com a piora do dano hepático (24).

2.3 SÍNDROME HEPATORRENAL

A síndrome hepatorrenal (SHR) é uma das principais causas de lesão renal aguda (LRA) progressiva que acomete pacientes com doenças hepáticas avançadas. A SHR não apresenta danos histológicos nos rins, uma vez que o dano é unicamente funcional, ocasionado pelas complicações decorrentes de doenças hepáticas crônicas graves, em especial a cirrose. Neste caso, a doença hepática promove a vasoconstrição e diminuição da perfusão renal e por consequência ocorre a diminuição da taxa de filtração glomerular (8,25).

De acordo com o Clube Internacional de Ascite - International Club of Ascite (ICA) em conjunto com demais autoridades mundiais da gastroenterologia, foi proposta a renomeação do termo disfunção renal, passando a chamar-se lesão renal aguda (LRA) (do inglês: Acute Kidney Injury - AKI) para designar todas as alterações renais presentes na cirrose (26).

Nesta perspectiva, houve a mudança dos critérios diagnósticos. A lesão renal aguda (LRA) é definida segundo os seguintes critérios: Aumento da creatinina sérica em ≥50% no prazo de 7 dias ou aumento na creatinina sérica em ≥0,3mg/dl (26,5µmol/l) em 2 dias ou oligúria por ≥6horas (27). Ademais, houve a classificação de acordo com o nível de gravidade da lesão renal aguda (LRA), podendo a doença transitar entre as classificações dependendo do seu estado de complexidade e gravidade atual (26,27). Logo, a SHR tipo 1 passa a denominar-se síndrome hepatorrenal com lesão renal aguda (SHR-LRA - no inglês: HRS-AKI), a forma mais

clássica da SHR na cirrose. Já a SHR tipo 2 passa a chamar-se síndrome hepatorrenal sem lesão renal aguda (SHR-SLRA - no inglês: HRS-NAKI) e é subclassificada em aguda e crônica (28).

O diagnóstico de SHR exige atender aos novos critérios do Clube Internacional de Ascite após descartar outras causas de lesão renal (34).

2.3.1 Fisiopatologia da SHR

A síndrome hepatorrenal (SHR) apresenta-se da seguinte forma: há uma forte vasoconstrição renal que resulta numa redução intensa da taxa de filtração glomerular (TFG), enquanto na circulação extra-renal há uma predominância da vasodilatação, causando hipotensão sistêmica. A doença é caracterizada por alteração funcional do rim, uma vez que os rins são histologicamente normais e a insuficiência renal é reversível se ocorrer o transplante hepático (29,30).

A fisiopatologia da SHR ainda não é inteiramente esclarecida; no entanto, sabe-se que a doença é causada pela vasodilatação esplênica em decorrência da hipertensão portal e cirrose. A cirrose em conjunto com a HP provoca a vasodilatação esplênica, acarretando na diminuição do volume sanguíneo efetivo na circulação sistêmica. Há a ativação do sistema renina-angiotesina-aldosterona, o que causa o aumento da retenção de sódio e vasoconstrição arteriolar.

No início da SHR, a perfusão sanguínea renal é mantida dentro dos padrões normais devido ao aumento da síntese de vasodilatadores renais, como é o caso das prostaglandinas. Porém, com a progressão da doença, há a piora da perfusão renal devido ao sub-preenchimento arterial, o que causa o dano funcional no rim, bem como a queda na taxa de filtração glomerular (31).

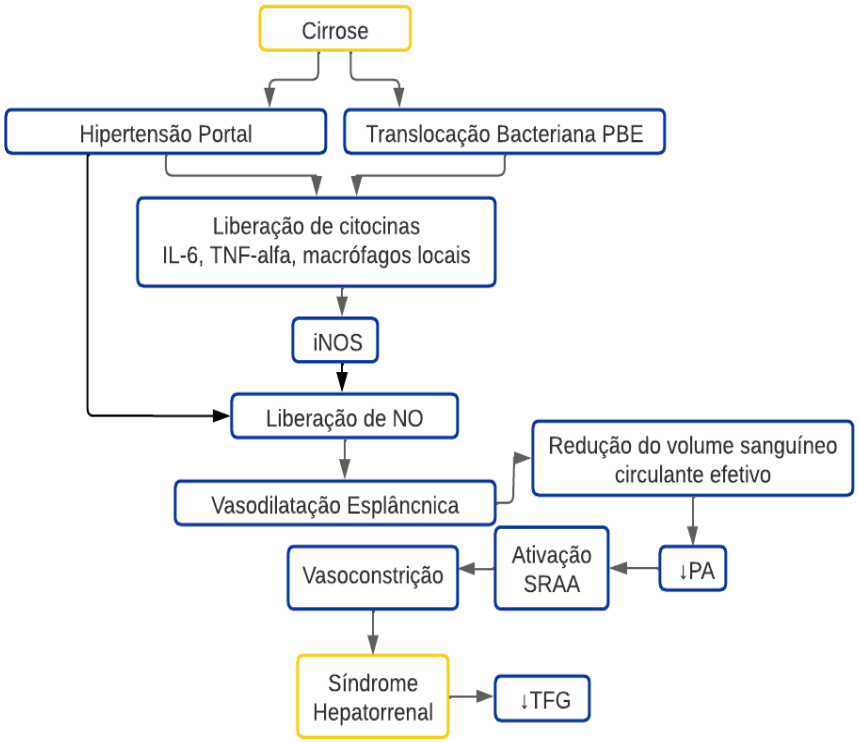

Figura 1 – Esquema da Fisiopatologia da SHR elaborado pelo autor.

2.3.2 Diagnóstico e tratamento

Devido à falta de testes específicos para o diagnóstico da SHR, o diagnóstico da doença baseia-se na exclusão de outros fatores causais de insuficiência renal em indivíduos afetados por cirrose. O tratamento na SHR tem como principal objetivo a reversão e solução do fator causador da lesão aguda renal. Esta reversão ocorre através da melhoria da funcionalidade hepática. Neste sentido, esta melhoria é alcançada através de terapia médica - não cirúrgica, ou através de transplante hepático (32,33,34).

No entanto, atualmente, a conduta medicamentosa mais utilizada para a SHR tem sido a administração de albumina juntamente com drogas vasoconstritoras, e dentre as mais utilizadas estão a terlipressina e a noradrenalina. De acordo com revisões sistemáticas e ensaios clínicos realizados para efeitos de comparação entre o uso dos dois medicamentos no tratamento da SHR, os estudos não demonstraram grandes diferenças entre eles. Contudo, é de notar que a noradrenalina requer a sua

administração em unidade de cuidados intensivos (UCI), enquanto que a terlipressina permite a sua utilização em enfermarias comuns (35).

A utilização de vasoconstritores aliados à albumina é considerada peça-chave no tratamento da SHR, visto reverterem a cadeia de eventos que precedem a doença. A administração de albumina intravenosa tem sido evidenciada por sua capacidade de reduzir a concentração de óxido nítrico e de outras citocinas (35,36).

A utilização de albumina no tratamento da SHR e cirrose favorece um melhor manejo do quadro clínico, bem como promove a diminuição dos agravos decorrentes das doenças. A albumina é a proteína em maior quantidade presente no plasma sanguíneo, sendo uma macromolécula responsável pelo controle da pressão oncótica do plasma e na modulação da distribuição de fluidos corpóreos. A síntese de albumina ocorre no fígado. No entanto, em pacientes cirróticos, a síntese endógena desta proteína está diminuída levando a um quadro de hipoalbuminemia definida por uma concentração de albumina sérica inferior a 35g/L (37).

Em muitos casos é inevitável a utilização de medicamentos diuréticos no manejo da SHR. Dentre as principais drogas utilizadas, destaca-se a furosemida e espironolactona. A $furosemida apresenta um efeito rápido e de curta duração (2 a 3 horas), e a espironolactona com uma duração maior, podendo ultrapassar 24 horas de meia vida (38).

O quadro de cirrose em conjunto com a SHR leva o indivíduo a desenvolver um quadro de hiperaldosteronismo, ocorrendo a superatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona que resulta em hipocalemia (baixa concentração de potássio no sangue). O quadro de hiperaldosteronismo aumenta a retenção de líquidos no paciente cirrótico. A utilização de drogas diuréticas é empregada no manejo da cirrose e diminuição da retenção hídrica (39). Conforme proposto por Felix (2005), a ingestão de sódio deve ser controlada ou até mesmo restrita em 60 a 90 mEq/dia de sódio, colaborando para a diminuição da necessidade de utilização de drogas diuréticas (38).

Contudo, o tratamento com reversão total e cura da doença é o transplante hepático, uma vez que proporciona uma sobrevivência mais longa em comparação com outros tratamentos, bem como uma melhor qualidade de vida para o indivíduo (40).

Não muito distante, tem evidenciado-se o interesse da comunidade acadêmica em buscar novas substâncias que sejam capazes de auxiliar no tratamento da SHR. Levando em consideração a complexidade do tratamento da doença e a relação direta com a qualidade de vida do indivíduo, é importante que novos estudos a fim de validar e identificar novas substâncias coadjuvantes no tratamento da SHR sejam realizados.

2.3.3 Cirrose Biliar Secundária como Modelo Experimental para estudo da Síndrome Hepatorrenal em ratos

A obstrução prolongada do ducto biliar em ratos é um modelo experimental para indução de cirrose biliar secundária. Neste modelo, as características da doença são estabelecidas em aproximadamente 28 dias com marcada proliferação ductal, edema e reações inflamatórias agudas, podendo, ainda, ocasionar alterações sistêmicas (41,42).

A cirrose biliar secundária provocada por obstrução do ducto biliar comum é caracterizada por perda progressiva da função hepática, hipertensão portal e algumas complicações adicionais que causam alta mortalidade (43). Este modelo de cirrose apresenta semelhanças em muitas das características observadas na cirrose em humanos e nas induzidas por CCl4, tais como a retenção de sódio, circulação hiperdinâmica, redução da resistência vascular periférica e aumento do débito cardíaco (44).

Ratos com ligadura de duto biliar desenvolvem disfunção renal, com um aumento da creatinina no plasma. Isto é associado com um aumento na atividade da renina plasmática sugerindo disfunção circulatória subjacente, tal como tem sido descrita em pacientes com cirrose avançada (25). A ligadura do ducto biliar comum (LDB) em ratos tem sido utilizada para estudar a cirrose e suas complicações sendo considerado um bom modelo para estudar a síndrome hepatorrenal (45,25).

2.4 ÔMEGA-3

Os ácidos graxos ômega-3 foram considerados lipídios anti-inflamatórios com base em estudos epidemiológicos com esquimós da Groelândia, onde predomina

uma dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados, provenientes de peixes e outros alimentos (46).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) da família dos ômega-3 compreendem um grupo de ácidos graxos que são principalmente representados pelo ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosa-hexaenóico (DHA), o qual é encontrado em altas concentrações em óleos de peixes, apresentaram efeitos antiinflamatórios, antiapoptóticos e antioxidantes em diversos estudos como diferentes modelos experimentais (47).

Foram relatados vários benefícios relacionados com a ingestão regular de ômega-3, entre os quais: diminuição das espécies reativas de oxigênio (ERO), prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, melhora da inflamação em doenças de origem inflamatória, e alterações imunológicas (48,46).

A utilização regular de ômega-3 está intimamente relacionada com a prevenção e redução da gravidade de várias doenças. Os ácidos graxos ômega-3 são facilmente encontrados em maiores quantidades na dieta da população mediterrânea, dado o elevado consumo de alimentos de origem vegetal, bem como peixes de águas frias, os quais apresentam elevados teores de ômega-3. Dentre os principais alimentos fontes de ômega-3 destacam-se: nozes, azeite de oliva, linhaça, salmão e chia (49).

Estes ácidos graxos são incorporados nos fosfolipídios das membranas celulares e assim melhoram a função biológica, que ocorre em várias estruturas, tais como no cérebro, retina, coração, fígado e rins (50). Alguns estudos já demonstraram que os ácidos graxos ômega-3 são capazes de controlar a inflamação diminuindo a proteína-C reativa (PCR), bem como a diminuição da liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios, pois os AGPIs ômega-3 competem com ácido araquidônico (AA), o principal representante de AGPIs da família ômega-6. AA é o precursor de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que têm efeitos pró-inflamatórios. Além disso, os AGPIs omega-3 são precursores de uma classe de lipídios (por exemplo, proteínas e resolvinas) que possuem efeitos anti-inflamatórios (51,50).

3 JUSTIFICATIVA

A SHR é uma complicação que determina um pior prognóstico para a cirrose e seu desenvolvimento está associado com uma probabilidade de sobrevivência de aproximadamente 15% em três meses. A insuficiência renal é uma complicação frequente e grave nos pacientes com cirrose hepática descompensada. A perda da função renal associa-se a um aumento da mortalidade e uma piora no prognóstico do transplante hepático. Um melhor conhecimento da etiologia e a instalação de um tratamento precoce são essenciais para um melhor prognóstico da doença. A SHR é responsável por 11% a 20% de todas as causas de lesão aguda renal, e está relacionada com aproximadamente 30% de aumento de mortalidade em pacientes hospitalizados portadores de SHR.

Um estudo de meta-análise apontou taxas de mortalidade de 58% no primeiro mês e de 63% no primeiro ano em pacientes cirróticos e comprometidos pela SHR (52,53,54). A pesquisa sobre a insuficiência renal na cirrose nos próximos anos deve ser focada em mecanismos de prevenção e tratamento com o objetivo de melhorar a sobrevida destes pacientes. Para isso mais estudos devem ser viabilizados para busca substâncias que possam atuar de forma coadjuvante no tratamento da cirrose e em consequência da SHR, colaborando de forma positiva na qualidade de vida e sobrevida dos pacientes comprometidos pela SHR.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar os efeitos da suplementação de ômega-3 em tecido renal de ratos com cirrose por ligadura do ducto biliar.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o estresse oxidativo renal através da medida de dano oxidativo e da atividade das enzimas antioxidantes em animais doentes e tratados com ômega-3.

- Determinar os níveis de óxido nítrico em animais doentes e tratados com ômega-3.
- Quantificar o dano ao DNA, apoptose e a viabilidade celular no tecido renal dos animais doentes e tratados com ômega-3.

5 REFERÊNCIAS

1 - Smith A et al. Cirrhosis: Diagnosis and Management. Am Fam Physician. 2019;(12):759-770.

2 - Solé C et al. Hepatorenal syndrome in the era of acute kidney i2 njury. Liver Int. 2018; 38: 1891–1901. https://doi.org/10.1111/liv.13893

3 - Roehlen N et al. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. Cells. 2020 Apr 3;9(4):875. doi: 10.3390/cells9040875. PMID: 32260126; PMCID: PMC7226751.

4 - Wong F et al. Confirm Study Investigators. Terlipressin plus Albumin for the Treatment of Type 1 Hepatorenal Syndrome. N Engl J Med. 2021 Mar 4;384(9):818-828. doi: 10.1056/NEJMoa2008290. PMID: 33657294.

6 - Bhat S et al. Omega-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease and Diabetes: a Review of Recent Evidence. Curr Cardiol Rep. 2023 Feb;25(2):51-65. doi: 10.1007/s11886-022-01831-0. Epub 2023 Feb 2. PMID: 36729217.

5 - Djuricic I, Calder PC. Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. Nutrients. 2021 Jul 15;13(7):2421. doi: 10.3390/nu13072421. PMID: 34371930; PMCID: PMC8308533.

6 - Bhat S et al. Omega-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease and Diabetes: a Review of Recent Evidence. Curr Cardiol Rep. 2023 Feb;25(2):51-65. doi: 10.1007/s11886-022-01831-0. Epub 2023 Feb 2. PMID: 36729217.

7 - Mohsen G et al. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Postoperative Inflammatory Response: A Systematic Review and Meta-Analysis. Nutrients. 2023 Jul 31;15(15):3414. doi: 10.3390/nu15153414. PMID: 37571352; PMCID: PMC10421202.

8 - Ojeda-Yuren AS et al. An Integrated Review of the Hepatorenal Syndrome. Ann Hepatol. 2021 May-Jun;22:100236. doi: 10.1016/j.aohep.2020.07.008. Epub 2020 Aug 23. PMID: 32846202.

9 - Fukui H et al. Evidence-based clinical practice guidelines for liver cirrhosis 2015. J Gastroenterol. 2016 Jul;51(7):629-50. doi: 10.1007/s00535-016-1216-y. Epub 2016 May 31. PMID: 27246107.

10 - Costa et al. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de cirrose hepática atendidos no Ambulatório de Hepatologia do Centro de Especialidades Médicas do CESUPA (CEMEC), em Belém - PA. GED gastroenterol. endosc. dig. 2016;(35):01-08.

11 - MR Poffo et al. The manage-ment of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. J Hepatol. 2008;(48):68-92.

12 - Bassani L. Perfil lipídico de pacientes cirróticos e sua correlação com os escores prognósticos [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 2011.

13 - Rosa DP et al. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. Arq Gastroenterol [Internet]. 2010Jan;47(1):72–8. Available from: https://doi.org/10.1590/S0004-28032010000100013

14 - Silva JB. et al. Potencial hepatoprotetor e antineoplásico da própolis vermelha produzida pela abelha|Apis melliferano semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira [online]. 2019, 39(09).

15 - Peghinelli VV et al. Efeito da rutina no tratamento da cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo experimental em ratos / Effect of rutin in the treatment of thioacetamide-induced liver cirrhosis: experimental study in rats. Brazilian Journal of Development, 2020;6(9), 64540–64557.

16 - Miltersteiner A et al. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. Acta Cir Bras [Internet]. 2003May;18(3):232–7. Available from: https://doi.org/10.1590/S0102-86502003000300011

17 - Bosch J et al. The manage-ment of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. J Hepatol. 2008;48(Suppl 1):S68-S92

18 - De Franchis R, Faculty BVI. Expanding consensus in portal hyper-tension: report of the Baveno VI consensus workshop: stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. J Hepatol. 2015;63:743-752.

19 - Ripoll C et al. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. Gastroenterology 2007;133:481–8.

20 - Turco et al. Portal Hypertension Pathogenesis and Diagnosis. Clin Liver Dis. 2019:573-587.

21 - Garcia-Tsao et al. Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by

the American Association for the study of liver diseases. Hepatology 2017; 65(1):310–35.

22 - Adebayo D et al. Refractory ascites in liver cirrhosis. Am J Gastroenterol 2019; 114:40–7.

23 - Pedrosa MSP et al. Os principais tipos e manifestações da Cirrose Hepática: uma atualização clínica. Brazilian Journal of Health Review, 2023;6(1), 4423–4439. https://doi.org/10.34119/bjhrv6n1-343

24 - Nardelli S et al. Spontaneous porto-systemic shunts in liver cirrhosis: Clinical and therapeutical aspects. World J Gastroenterol. 2020 Apr 21;26(15):1726-1732. doi: 10.3748/wjg.v26.i15.1726. Epub 2020 Apr 14. PMID: 32351289; PMCID: PMC7183860.

25 - Pereira RM et al. Development of hepatorenal syndrome in bile duct ligated rats. World J Gastroenterol. 2008 Jul 28;14(28):4505-11. doi: 10.3748/wjg.14.4505. PMID: 18680230; PMCID: PMC2731277.

26 - Gupta K et al. Acute kidney injury and hepatorenal syndrome in cirrhosis. World J Gastroenterol. 2021 Jul 14;27(26):3984-4003. doi: 10.3748/wjg.v27.i26.3984. PMID: 34326609; PMCID: PMC8311533.

27 - Kellum JA et al. Acute kidney injury. Nat Rev Dis Primers 7, 2021;52. https://doi.org/10.1038/s41572-021-00284-z

28 - Simonetto DA et al. Hepatorenal syndrome: pathophysiology, diagnosis, and management . BMJ. 2020.

29 - Wadei HM et al. Hepatorenal syndrome: pathophysiology and management. Clin J Am Soc Nephrol. 2006;1(5):1066–1079.

30 - Ginès P, Schrier RW. Renal failure in cirrhosis. N Engl J Med. 2009;361(13):1279–1290.

31 - Chmielewski J et al. Hepatorenal Syndrome: Physiology, Diagnosis and Management. Semin Intervent Radiol. 2018 Aug;35(3):194-197. doi: 10.1055/s-0038-1660797. Epub 2018 Aug 6. PMID: 30087522; PMCID: PMC6078701.

32 - Papaluca T, Gow P. Terlipressin: current and emerging indications in chronic liver disease. J Gastroenterol Hepatol 2018; 33:591-8.

33 - Dundar HZ, Yılmazlar T. Management of hepatorenal syndrome. World J Nephrol 2015;4:277.

34 - Angeli P et al. News in pathophysiology, definition and classification of hepatorenal syndrome: A step beyond the International Club of Ascites (ICA) consensus document. J Hepatol. 2019 Oct;71(4):811-822. doi: 10.1016/j.jhep.2019.07.002. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31302175.

35 - De Mattos et al. Hepatorenal syndrome: Current concepts related to diagnosis and management. Ann Hepatol, 2016. 15: 474–81.

36 - Chen TA et al. Effect of intravenous albumin on endotoxin removal, cytokines, and nitric oxide production in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. Scand J Gastroenterol, 2009. 44: 619–25.

37 - Fanali G et al. Molecular Aspects of Medicine Human serum albumin: From bench to bedside. Molecular Aspects of Medicine 2012;33(3), 209–290.

38 - Felix, Valter Nilton. Síndrome hépato-renal: subtítulo do artigo. JBG: J. bras. gastroenterol, Rio de Janeiro, v. 5, n. 4, p. 154-159, dez./2005.

39 - Danilovic DLS et al. Hiperaldosteronismo primário causado por aldosteronoma: problemas no diagnóstico etiológico. Arquivos Brasileiros De Endocrinologia & Metabologia, 2007;51(3), 478–487. https://doi.org/10.1590/S0004-27302007000300018

40 - Boyer TD et al. Terlipressin Study Group (2011) Impact of liver transplantation on the survival of patients treated for hepatorenal syndrome type 1. Liver Transpl 17:1328–1332.

41 - Kountouras J et al. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. Br. J. exp. Path. 1984;(65):305-311.

42 - Colares JR et al.. Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. World J Gastroenterol 2016; 22(40): 8918-8928 [PMID: 27833383 DOI: 10.3748/wjg.v22.i40.8918]

43 - Oberti F et al.. Experimental models of portal hypertension. Gastroenterol Clin Biol. 2000;24(10):896-901.

44 - Vieira EK et al. Quercetin treatment ameliorates systemic oxidative stress in cirrhotic rats. ISRN Gastroenterol. 2011;2011:604071.

45 - Silveira KC et al. Cirrhosis induces apoptosis in renal tissue through intracellular oxidative stress. Arq Gastroenterol. 2015;52:65-71.

46 - Brito JVR et al. Suplementação de Ômega-3 em praticante de exercício físico intenso. REVISA. 2019;8(2):215-27.

47 - Hernandez-Rodas M et al. Benefits of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease. Rev Chil Nutr 2016;43 (2):196-205. 47.

48 - Stefanello FPDS et al. Análise do consumo de alimentos fontes de ômega 3 por participantes de grupos de conivências: subtítulo do artigo. Rev. Bras. Geariatr. Grerontol.: subtítulo da revista, Passo Fundo, v. 22, n. 6, p. 1-9, dez./2005.

49 - Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. Biochim Biophys Acta. 2015 Apr;1851(4):469-84. doi: 10.1016/j.bbalip.2014.08.010. Epub 2014 Aug 20. PMID: 25149823.

50 - Howe PRC et al. Effects of long chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Brain function in mildly hypertensive older adults. Nutrients. 2018;10(1413):1-14.

51 - Weylandt KHC et al. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: Towards an understanding of resolvin and protectin formation Omega-3 fatty acids and their resolvin/protectin mediators. Prostaglandins & other Lipid Mediators 2012;97:73-82.

52 - Amin AA et al. Epidemiology, Pathophysiology, and Management of Hepatorenal Syndrome. Semin Nephrol. 2019 Jan;39(1):17-30. doi: 10.1016/j.semnephrol.2018.10.002. PMID: 30606404.

53 - Nassar M et al. Hepatorenal Syndrome. World J Hepatol. 2021 Sep 27;13(9):1058-1068. doi: 10.4254/wjh.v13.i9.1058. PMID: 34630874; PMCID: PMC8473490.

54 - Fede G et al. Renal failure and cirrhosis: a systematic review of mortality and prognosis. J Hepatol. 2012 Apr;56(4):810-8. doi: 10.1016/j.jhep.2011.10.016. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22173162.

O presente artigo foi submetido a revista *World Journal of Nephrology* de acordo com código de submissão: 95627

6 ARTIGO EM PORTUGUÊS

EFEITO PROTETOR DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA 3 NA SÍNDROME HEPATORENAL EM RATOS WISTAR.

Autores: João Bruno Beretta de Almeida Duailibe[1], bruno.beretta@hotmail.com, ORCID0000-0001-8797-8682; Cassiana Macagnan Viau[3] Jenifer Saffi[2,3], Marilene Porawski[1,2], marilenep@ufcspa.edu.br, ORCID: 0000-0002-0940-2183.

Afiliação: [1]Programa de Pós-Graduação em Hepatologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil;
[2]Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brasil.
[3]Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

EFEITO PROTETOR DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA-3 NA SÍNDROME HEPATORRENAL EM RATOS WISTAR

Introdução: A síndrome hepatorrenal (SHR) é um dos tipos mais comuns de lesão renal aguda (LRA) que afeta doentes cirróticos e caracteriza-se pela redução do fluxo sanguíneo renal. É uma das complicações mais graves que afetam os pacientes cirróticos com doença avançada. **Objetivo:** Estudar o efeito protetor da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega-3 no tecido renal de ratos cirróticos. **Métodos:** A cirrose biliar secundária foi induzida em ratos por ligadura do ducto biliar comum (LDB). Foram utilizados 24 ratos Wistar machos divididos nos seguintes grupos: Grupo I (controle); Grupo II (tratado com ômega-3, 1g/kg de peso corporal); Grupo III (LDB tratado com ômega-3, 1g/kg de peso corporal) e Grupo IV (LDB sem tratamento). A cirrose hepática foi induzida pelo modelo de ligadura do duto biliar (LDB) com duração de 28 dias. Após o período de experimento, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico, os rins foram dissecados, retirados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80ºC para posterior análise. Foram avaliados o estresse oxidativo, os metabólitos do óxido nítrico, o dano ao DNA pelo ensaio cometa, o teste de viabilidade celular e a presença de apoptose no tecido renal. Os dados analisados pela variância unidirecional (ANOVA) e as médias foram comparadas usando o teste Tukey, com $p \leq 0,05$. **Resultados**: O ômega-3 diminuiu significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ($p < 0,001$) e a formação de malondialdeído (MDA) no grupo LDB + ômega-3 ($p < 0,001$). A atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT aumentou no grupo LDB + ômega em relação ao grupo LDB ($p < 0,01$). A produção de óxido nítrico, o dano ao DNA e a caspase 9 foram significativamente diminuídas no grupo LDB tratado com ômega-3 e houve um aumento do potencial eletroquímico mitocondrial ($p < 0,001$) no grupo LDB tratado com ômega-3 em relação ao grupo LDB. Não foram observadas alterações no índice de sobrevivência celular na síndrome hepatorrenal com ômega-3 quando comparadas ao grupo controle ($p > 0,05$). **Conclusões:** O estudo mostra que o Omega-3 é capaz de proteger a integridade e função celular do dano oxidativo através do aumento das enzimas antioxidantes, inibição da formação de radicais livres e diminuição da apoptose.

Palavras-chave: Ácido graxo poli-insaturado ômega-3, Síndrome hepatorrenal, Espécies reativas de oxigênio, Apoptose.

PROTECTIVE EFFECT OF LONG CHAIN OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS (N-3 PUFAS) ON HEPATORENAL SYNDROME IN RATS

Introduction: Hepatorenal syndrome (HRS) is the most common types of acute kidney injury (AKI) that affects cirrhotic patients. Is characterized by reduced renal blood flow and is the most serious complications that affect cirrhotic patients with the disease advanced. **Aim:** Evaluated the protective effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the kidney of cirrhotic rats. **Methods:** Secondary biliary cirrhosis was induced in rats by biliar duct ligation (BDL) to 28 days. We used 24 male Wistar rats divided into the following groups: Group I (control); Group II (treated with omega-3, 1g/kg of body weight); Group III (BDL treated with omega-3, 1g/kg of body weight) and Group IV (BDL without treatment). After the experimental period, the animals were euthanized by an overdose of anesthetic, the kidneys were dissected, removed and frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80ºC for later analysis. Oxidative stress, nitric oxide metabolites, DNA damage by the comet assay, cell viability test and the presence of apoptosis in kidney were evaluated. Data analyzed by one-way variance (ANOVA), and means were compared using the Tukey test, with $p \leq 0.05$. **Results:** Omega-3 significantly decreased the production of reactive oxygen species (ROS) ($p < 0.001$) and the formation of malondialdehyde (MDA) in the BDL + omega-3 group ($p < 0.001$). The activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT increased in the BDL + omega compared to the BDL group ($p < 0.01$). Nitric oxide production, DNA damage and caspase 9 were significantly decreased in the BDL treated with omega-3 and there was an increase in mitochondrial electrochemical potential ($p < 0.001$) in the BDL treated with omega-3 compared to the BDL. No changes were observed in the cell survival index in hepatorenal syndrome with omega-3 when compared to the control group ($p > 0.05$). **Conclusions:** The study shows that omega-3 is capable of protecting cellular integrity and function from oxidative damage, through increasing antioxidant enzymes, inhibiting the formation of free radicals and decreasing apoptosis.

Keywords: Omega-3 polyunsaturated fatty acid, Hepatorenal syndrome, Reactive oxygen species, Apoptosis

INTRODUÇÃO

A cirrose hepática é oriunda de diversos eventos causais, desde a hepatotoxicidade induzida por drogas, infecções por hepatites, consumo excessivo de álcool, doenças metabólicas primárias e doenças que afetam o trato biliar. No percurso da doença ocorre a destruição contínua dos hepatócitos e a deposição de colágeno, o que confere ao fígado um encolhimento, alterações anatômicas e funcionais. Tais alterações dificultam a circulação sanguínea intra-hepática, ademais, com o avanço e agravamento da doença, uma série de eventos decorrentes da alteração hepática acontecem. Dentre estes eventos, destacam-se o desenvolvimento da hipertensão portal, formação de varizes gastroesofágicas, ascite, encefalopatia hepática, depleção da síntese de fatores de coagulação e síndrome hepatorrenal (Ojeda-Yuren et al., 2021).

Em 2016, mais de 40 milhões de americanos morreram devido às complicações decorrentes da cirrose, tornando-se a décima segunda principal causa de morte nos Estados Unidos neste ano (Kochanek et al, 2017).

Uma das principais consequências no estágio avançado da cirrose é o surgimento da síndrome hepatorrenal (SHR), um dos tipos mais comuns de lesão renal que afeta pacientes com doenças hepáticas graves e descompensada e caracteriza-se pela diminuição da perfusão renal e vasoconstrição (Russ et al, 2015; Ginés et al, 2018). São reconhecidas duas formas de síndrome hepatorrenal. A primeira representa um comprometimento agudo da função renal, SHR-LRA (lesão renal aguda); enquanto a segunda representa uma disfunção renal mais crônica, SHR-LRC (lesão renal crônica) (Simonetto; Gines; Kamath, 2020). O diagnóstico de SHR exige atender aos novos critérios do Clube Internacional de Ascite após descartar outras causas de lesão renal (Angeli et al., 2019).

Poucos estudos analisam o efeito do tratamento com substâncias antioxidantes no rim de animais cirróticos, uma vez que há consenso de que a disfunção renal na cirrose é resultado das alterações hemodinâmicas e da ativação de mecanismos hormonais compensatórios. Estudos anteriores já demonstraram que, embora não haja alterações estruturais detectáveis no tecido renal de animais cirróticos por LDB, há perda de integridade e função celular no rim, com apoptose, ativação da caspase-3, dano oxidativo às membranas celulares e dano ao DNA

causado pelo estresse oxidativo desencadeado pela cirrose hepática (Silveira et al, 2015).

Os ácidos graxos ômega-3 são considerados lipídios anti-inflamatórios desde os estudos epidemiológicos realizados por Kronmann e Green em 1980 com esquimós da Groelândia que tinham uma dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados derivados de peixe (Kromann; Green 1980).

Os ácidos graxos ômega-3 são conhecidos por modular a resposta imune alterando os fosfolipídios de membrana e prevenindo um perfil pró-inflamatório (Howe et al, 2018). O benefício da suplementação com ômega-3 é bem caracterizado para a proteção ao risco cardiovascular, principalmente pela redução quase linear dos triglicerídeos e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) associadas à ingesta do ômega-3 (Wang et al., 2023). Também são relatados outros benefícios relacionados com a ingestão regular de ômega-3, entre os quais: diminuição das espécies reativas de oxigênio (ERO), da proteína c-reativa (PCR), bem como na diminuição da liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (Howe et al, 2018; Stefanello, 2019).

Nas doenças hepáticas alguns estudos têm reportado uma ação benéfica dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 diminuindo a sepse e os marcadores inflamatórios em pacientes com hepatite aguda grave (Kulkami et al., 2021), reduzindo a inflamação e fibrose em pacientes com atresia biliar (Sumida et al., 2018) e diminuindo a porcentagem de gordura hepática em pacientes com EHNA tratados como ácido docosahexaenóico (DHA) purificado (Scorletti et al., 2014), além de indicar uma redução significativa no risco de doença hepática, particularmente DHGNA com o uso regular da suplementação com ômega-3 (Vell et al., 2023).

Neste sentido, a utilização regular de ômega-3 está intimamente relacionada com a prevenção e redução da gravidade de várias doenças. Os ácidos graxos ômega-3 são encontrados em maiores quantidades em alimentos como nozes, linhaça, chia, sardinha, salmão e atum (Calder et al, 2015). Sendo assim, a suplementação de ômega-3 pode representar uma terapia adicional aos indivíduos comprometidos pela SHR; no entanto, pouco se sabe do papel desses ácidos graxos em pacientes com SHR, incluindo os efeitos sobre as concentrações de citocinas inflamatórias e sobre a melhora no percurso da doença.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação com ácidos graxos ômega-3 sobre o estresse oxidativo e apoptose no tecido renal dos animais doentes e tratados com ômega-3.

MATERIAIS E MÉTODOS

Fármacos e reagentes: O ômega-3 utilizado no estudo foi marca Catarinense. Foram obtidos anticorpos primários anti-caspase 9, anti-caspase 3 e anticorpos secundários anti-caspa IgG (H+L) F(ab')2 fragmentos conjugado com Alexa Fluor® 488 da Cell Signaling Technology (USA) e Invitrogen (Grand Island, NY, USA), respectivamente. Todos os outros reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e da mais alta pureza.

Animais e Modelo Experimental de Ligadura de Duto Biliar: Foram utilizados 24 ratos Wistar machos adultos com peso médio de 300g. Os animais foram divididos em quatro grupos com 6 animais por grupo: Grupo I (controle) - receberam 1 mL de solução fisiológica por gavagem; Grupo II (tratado com ômega-3 na dose de 1g/kg de peso) - receberam 1mL de ômega-3 por gavagem; Grupo III (LDB tratado com ômega-3 na dose de 1g/kg de peso) – submetidos ao modelo de ligadura de ducto biliar e receberam 1mL de ômega-3 por gavagem; e Grupo IV (LDB sem tratamento) – receberam 1mL de solução fisiológica por gavagem. A suplementação diária com ômega-3 iniciou no 14º dia após a LDB e seguiu durante 2 semanas até a morte dos animais no 28º dia após a LDB. Todos os procedimentos experimentais realizados nos animais estão de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 08.10.2008) e foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFCSPA com o parecer 146/12.

A cirrose hepática foi induzida pelo modelo de ligadura do duto biliar (LDB). Resumidamente, os ratos foram anestesiados com cloridrato de xilazina a 2% (50 mg/kg) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.). A cirrose biliar secundária foi induzida nos animais através da ligadura dupla e secção total do ducto biliar comum. Os animais foram sacrificados após 28 dias da obstrução, tempo em que há completo desenvolvimento tanto da colestase quanto da fibrose e claro estabelecimento das alterações bioquímicas características da cirrose hepática.

Os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico. Os rins foram dissecados, retirados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80ºC. O rim congelado de cada rato foi homogeneizado em tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo 140 mM KCl. (1:10 p/v) e centrifugados durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi imediatamente separado e utilizado para as avaliações bioquímicas.

Avaliação do estresse oxidativo no tecido renal

Medida de radicais livres

Os homogeneizados de rim foram incubados com 100 µL de 25 µM diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) por 30 min a 37°C. No final do período de incubação, a fluorescência dos homogeneizados foi medida num leitor de microplacas SpectraMax M2e (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). Os comprimentos de onda de excitação/emissão para DCFDA foram 480/520 nm. Os valores de fluorescência relativa (RFU) foram expressos como proteína RFU mg-1 (Mattiello et al., 2015).

Medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação através da técnica TBARS é uma medida de peroxidação lipídica e foi determinada de acordo com Esterbauer e Cheeseman (1990). Os homogeneizados foram misturados com ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico 0,6 % e aquecidos num banho de água a 100°C durante 25 min. TBARS foi determinado pela absorção a 535 nm. Os resultados foram reportados como nmol de TBARS por mg de proteína.

Atividade da superóxido dismutase

A superóxido dismutase citosólica (SOD; EC 1.15.1.1) foi medida de acordo com Misra e Fridovich a 30°C. A taxa de auto-oxidação da epinefrina, que é progressivamente inibida por quantidades crescentes de SOD no homogenato, foi monitorada espectrofotometricamente a 560 nm. A quantidade de enzima que inibe a auto-oxidação da epinefrina a 50% da inibição máxima foi definida como 1 U de atividade da SOD.

Atividade da catalase

A atividade de CAT (EC 1.11.1.6) foi testada de acordo com o método descrito por Maehly e Chance et al., (1954), com base no desaparecimento de H_2O_2 a 240 nm. Brevemente, 10 µL de homogeneizado foi adicionado a 180 µL de tampão de fosfato de potássio de 20 mM pH 7,2. Subsequentemente, foram adicionados 10 µL de 5 mM H_2O_2 e a absorbância foi imediatamente registada a cada 30s durante 10 min, utilizando SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). Uma unidade CAT é definida como um µmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto e a atividade específica é calculada como Unidades CAT/mg de proteína.

Medida dos metabólitos do óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi estimada através da medição da quantidade de nitrito, um metabólito estável de NO (Freitas et al., 2005). Em resumo, 100 µL homogeneizados foram misturados com 100 µL do reagente Griess (1% sulfanilamida; 0,1% naftilenodiamina; 2,5% H_3PO_4) à temperatura ambiente. Após 20 min, a absorbância foi medida a 540 nm utilizando o leitor de microplaca SpectraMax M2e (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, Califórnia). Foi utilizada uma curva de calibração de nitritos para converter a absorbância em nitritos µM.

Ensaio Cometa

O ensaio do cometa alcalino foi realizado como descrito anteriormente (Singh, 1988). Brevemente, 10 µL de células foram misturadas com 90 µL de agarose e espalhadas numa lâmina de microscópio com agarose e colocadas a 4°C durante 5 min para permitir a solidificação. As células foram lisadas em alta concentração de sal e detergente (2,5 M NaCl, 100 mM Na2EDTA, 10 mM Tris com 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO) durante 2 h.

As lâminas foram retiradas da solução de lisagem e lavadas três vezes com PBS. Subsequentemente, as células foram expostas a condições alcalinas (300 mM NaOH/1 mM Na2EDTA, pH >13, 30 min, 4°C) para permitir o desenrolamento do DNA. A eletroforese foi conduzida durante 25 min a 25 V e 300 mA (94 V/cm). Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas e coradas com prata (Nadin, 2001).

Cem células foram pontuadas visualmente de acordo com o comprimento da cauda e a quantidade de DNA presente na cauda. A cada cometa, foi atribuído um valor arbitrário de 0-4 (0, não danificado; 4, maximamente danificado), como descrito por Collins et al. (1995). A pontuação de dano foi assim atribuída a cada amostra e pode variar entre 0 (completamente não danificado: 100 células X 0) e 400 (com dano máximo: 100 células X 4). As diretrizes e recomendações internacionais para o ensaio cometa consideram que a pontuação visual de cometas é um método de avaliação bem validado, uma vez que está altamente correlacionado com a análise de imagem baseada em computador (Collins et al. 1995; Nadin et al. 2001).

Medida de viabilidade celular

A viabilidade celular relativa determinada pelo ensaio de exclusão de corante azul-tripan (TBDE) foi utilizada como medida citotóxica (Silveira et al. 2015). A coloração de azul de tripano é um método de longa data e amplamente utilizado para identificar células mortas. Apenas células com membranas intactas podem efetivamente excluir o corante, pelo que as células mortas com membranas comprometidas ficam coradas.

Para cada grupo, foram misturados homogeneizados com solução 0,4% de azul-tripano. A citotoxicidade (a taxa inibitória do crescimento celular) foi determinada a partir do número de células viáveis (sem cor) nas amostras tratadas como percentagem do controle de PBS. Utilizamos o Contador de Células Automatizado Countess® (Invitrogen). O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Avaliação da apoptose por análise de citometria de fluxo

A Anexina V-PE foi utilizada em conjunto com um corante 7-AAD para distinguir células apoptóticas (Anexina V-PE positivo, 7-AAD negativo) de células necróticas (Anexina V-PE positivo, 7-AAD positivo). Após tratamento, as células foram recolhidas e ressuspendidas em 40 µL de tampão de ligação com 2 µL de Anexina V-PE. As células foram incubadas durante 15 min no escuro à temperatura ambiente.

Após incubação, foram adicionados 160 µL de tampão de ligação e 2 µL de 7-AAD. As células foram incubadas durante 5 min e foi adicionado 200 µL de tampão de ligação. Antes da análise, as células foram filtradas e os dados foram coletados e

analisados por um citômetro de fluxo FACS Calibur com software CellQuest, num total de 10.000 eventos por amostra. A fluorescência foi medida e a percentagem de células viáveis, apoptóticas precoces, apoptóticas tardias e necróticas foi determinada (Viau et al. 2014).

Quantificação da clivagem da caspase 9 por análise de citometria de fluxo

Após tratamento, as células foram recolhidas e ressuspendidas em 25 µL PBS e fixadas com 4% de formaldeído. Após permeabilização e bloqueio (0,2% Triton X-100 em PBS e 1% BSA), as células foram incubadas com os anticorpos primários diluídos 1:1000 durante 1h à temperatura ambiente, seguidos de incubação com anticorpo secundário FITC anti-coelho a 1:1000 durante 1h à temperatura ambiente no escuro. A intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias foi traçada em histogramas, e a intensidade média de fluorescência foi calculada utilizando o software CellQuest.

Ensaio do potencial eletroquímico mitocondrial

Após tratamento, as células foram incubadas com 2 mM Rh123 (rodamina 123) durante 30 minutos a 37° C, lavadas e depois ressuspendidas em 100 µL PBS. O potencial electroquímico mitocondrial está correlacionado com a intensidade de fluorescência de Rho123 (com diminuição da fluorescência significando perda do potencial electroquímico mitocondrial) (Emadi et al. 2010). A citometria de fluxo foi realizada quando um FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, Estados Unidos) com excitação a 488nm e emissão lida usando um filtro de 525-550nm.

Análise estatística

Os dados foram analisados por análise de variância unidireccional (ANOVA), e as médias foram comparadas usando o teste Tukey, com $p \leq 0,05$ considerado como estatisticamente significativo usando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (Intuitive Software for Science, São Diego, CA, EUA). Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão (EP). Todas as análises foram realizadas em duplicado.

RESULTADOS

Investigamos o efeito do tratamento com ômega 3 em alguns parâmetros de estresse oxidativo no tecido renal de ratos. Avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio utilizando a reação com diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA), o qual libera fluorescência quando oxidado por espécies reativas de oxigênio (Mattiello et al., 2015). Como pode ser observado na Figura 1, o ômega-3 diminuiu significativamente a produção de ERO ($p<0,001$).

A técnica TBARS baseia-se na utilização das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico que estão presentes em amostras biológicas na forma de hidróxidos lipídicos e aldeídos, e estes são aumentados como resposta ao estresse oxidativo. Na reação do ensaio TBARS ocorre a reação entre duas moléculas de TBA e uma de malonaldeído (MDA) resultando em um pigmento rosa o qual é medido sua absorção.

O MDA é resultante do processo de peroxidação lipídica, sendo um produto secundário durante a oxidação de ácidos poli-insaturados. Tal determinação em amostras biológicas é indicativo de lipoperoxidação (Esterbauer; Cheeseman, 1990). O dano oxidativo em membrana medido pela técnica de TBARS mostrou-se aumentado nos animais cirróticos por LDB e foi reduzido nos animais tratados com ômega-3 ($p<0,001$) (Figura 2).

Quanto à atividade das enzimas antioxidantes (Figura 3 e 4), o tratamento com ômega-3 aumentou a atividade da SOD ($p<0,01$) e a atividade da CAT ($p<0,001$). A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada pelo conteúdo dos seus metabólitos, nitritos e nitratos, medidos pela técnica de Griess. Como mostrado na Figura 5, o tratamento com ômega-3 diminuiu a produção de NO ($p<0,001$).

Os agentes tóxicos ao DNA podem alterar o conteúdo ou a estrutura dos cromossomos, bem como a sequência dos pares de bases do DNA (McGregor, 2000). Para avaliar os danos no DNA, realizamos o ensaio cometa alcalino. Como mostrado na Figura 6, o ômega 3 diminuiu significativamente os danos no DNA presente nos animais cirróticos ($p<0,001$).

A apoptose no tecido renal foi avaliada pela caspase-9 que se mostrou reduzida nos animais cirróticos tratados com ômega-3 ($p<0,01$) (Figura 7). Além disso, as células do tecido renal dos animais tratados com ômega-3 apresentaram

maior taxa de sobrevivência quando comparados aos animais cirróticos ($p<0,001$) (Figura 9). Observou-se também um aumento do potencial eletroquímico mitocondrial causado pelo tratamento com ômega-3 ($p<0,01$) indicando a preservação da integridade da membrana mitocondrial (Figura 8).

DISCUSSÃO

A cirrose hepática descompensada em estágio avançado é de difícil tratamento, visto acometer diversos sistemas e órgãos, causando inúmeras complicações como hipertensão portal, ascite, encefalopatia hepática, peritonite bacteriana espontânea, síndrome hepatorrenal, dentre outras (Ge OS et al., 2016). A SHR é um distúrbio que envolve a deterioração da função renal causada principalmente por uma disfunção circulatória sistêmica (Ojeda-Yuren et al., 2021).

Na SHR, o comprometimento da função renal ocorre pela constrição significativa dos vasos sanguíneos que irrigam os rins. Tal situação decorre da vasodilatação esplâncnica, que gera o aumento da volemia central, bem como há a interferência de mecanismos reflexos renais em resposta à hipertensão portal. A síndrome hepatorrenal é entendida como um mau prognóstico aos pacientes hepatopatas, visto apresentar elevada taxa de mortalidade, principalmente em pacientes descompensados e não candidatos ao transplante hepático (Wu et al., 2022).

A utilização dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 tem despertado o interesse de pesquisadores nas últimas décadas devido aos seus vários papéis desempenhados no tratamento e redução do risco de doenças. Os principais tipos de ômega-3 são os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), os quais são encontrados em peixes de águas frias. No entanto, o ômega-3 pode ser também encontrado em sementes e oleaginosas, como nozes, castanhas, linhaça e sementes de girassol; porém, nestes vegetais, o ômega-3 está presente na forma de ácido linolênico (ALA), um percursor da síntese endógena de EPA e DHA no corpo humano; todavia, essa bioconversão é limitada (Shahidi et al., 2018).

Inúmeros estudos têm evidenciado os benefícios da utilização de ômega-3 em diversas doenças como no Alzheimer (Cole et al. 2009); nas doenças cardiovasculares (Mozaffarian et al. 2016); na melhora do sistema imunológico e

modulação inflamatória (Larsson et al. 2004); na esquizofrenia (Su et al. 2001); depressão (Su et al. 2014) e cânceres (Prener et al. 1996).

No presente estudo, utilizamos como modelo animal ratos submetidos à ligadura do ducto biliar durante 28 dias, conforme protocolo de Kountouras et al, 1984, o que permite o desenvolvimento do quadro clínico da cirrose biliar secundária desencadeada pelo acúmulo de bile no parênquima hepático. Neste modelo, a partir de 4 semanas da LDB, é possível identificar características da SHR, como ascite, desequilíbrio hídrico, retenção de sódio e aumento da creatinina (Pereira et al., 2008). Nesta perspectiva, indagamos sobre os benefícios oferecidos pela suplementação de ômega-3 frente ao quadro complexo e de difícil manejo que a síndrome hepatorrenal apresenta aos pacientes comprometidos pela doença.

Com esse modelo, pudemos avaliar o efeito da suplementação diária com 1g/Kg de peso de ômega-3 durante 2 semanas a partir do 14º dia da LDB no tecido renal de ratos cirróticos. Observamos uma redução significativa nos marcadores de estresse oxidativo com diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio, na lipoperoxidação medida pelas substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, melhora da disfunção mitocondrial avaliada pelo potencial eletroquímico mitocondrial e aumento na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase.

Tanto o EPA como o DHA tem uma série de efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. A inflamação e o estresse oxidativo estão inter-relacionados e o estresse oxidativo pode ativar vias de sinalização inflamatória, enquanto a inflamação induz o estresse oxidativo. Por isso, agentes que atuam na redução do estresse oxidativo também podem ter ação anti-inflamatória e vice-versa (Miles; Calder, 2021).

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 podem agir como antioxidantes e podem modular os processos inflamatórios (Oppedisano et al., 2020). Estudos de intervenção demonstraram que o aumento da ingestão de EPA + DHA resulta em aumento nas concentrações desses ácidos graxos nas membranas celulares o que pode ser, em parte, responsável pela redução na lipoperoxidação de membranas.

Além disso, eles diminuem a produção de eicosanóides derivados do AA (Calder, 2015; Djuricic, 2014; Giacobbe et al., 2020). O aumento no conteúdo de ômega-3 está associado à diminuição dos níveis de outros marcadores inflamatórios, incluindo várias citocinas e quimiocinas, proteínas de fase aguda e moléculas de adesão (Calder, 2020; Djuricic, Calder, 2021).

A utilização de ômega-3 em modelo animal de hepatite também foi capaz de reduzir a produção de ERO (LI et al., 2006). Já em pacientes com DHGNA avançada os efeitos da suplementação com ômega-3 não são muito evidentes. Porém, em estágios mais precoces da doença hepática, a suplementação com ômega-3 pode ser eficaz para neutralizar o estresse oxidativo e a esteatose (Yang et al., 2019; Spooner, 2023; Jump, 2018), uma vez que existe uma correlação entre DHGNA e depleção de ácidos graxos poli-insaturados (Videla et al., 2022).

Em modelo animal de doença alcoólica hepática a suplementação com ômega-3 diminuiu a esteatose e a lesão hepática induzida por álcool através de múltiplos mecanismos, incluindo diminuição da lipogênese de novo e mobilização lipídica do tecido adiposo, aumento da beta-oxidação de ácidos graxos mitocondriais, redução da inflamação hepática e do estresse oxidativo (Wang et al., 2019).

A diminuição da inflamação decorre dos efeitos já bem descritos do EPA e principalmente do DHA na competição com o AA pela enzima delta-6-desaturase e consequente formação de metabólitos com ação anti-inflamatória como as resolvinas, maresinas e protectinas. A diminuição do acúmulo de lipídeos no fígado é mediada através da modulação da atividade dos fatores de transcrição nuclear, como os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), proteína 1c de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1c) e proteína de ligação responsiva a carboidratos (ChREBP), envolvidos em vias inflamatórias e no metabolismo lipídico do fígado (Calder, 2015; Scorletti, Byrne, 2018).

A utilização de ômega-3 na doença hepática melhora a condição do fígado e com isso diminui os danos no tecido renal, uma vez que as alterações renais observadas na SHR são decorrentes das complicações da cirrose. Estudos anteriores já demonstraram que o uso de antioxidantes melhora e/ou protege o fígado do desenvolvimento da cirrose e diminui as complicações decorrentes da doença (Fernandes et al., 2021; Bona et al., 2022; Colares et al., 2022).

Animais cirróticos tratados com melatonina apresentaram redução nas transaminases hepáticas no sangue, diminuição da lipoperoxidação e aumento na atividade da SOD no fígado o que levou à redução no dano hepático (Bona et al., 2022). Também no modelo de cirrose por ligadura de ducto biliar, o tratamento com melatonina melhorou os parâmetros bioquímicos e histológicos e os marcadores inflamatórios do fígado.

Foram observadas redução significativa na lipoperoxidação, na atividade da SOD e nos níveis de óxido nítrico (Colares et al., 2022). Em modelo de hepatite aguda grave a combinação resveratrol + ε-viniferina teve efeito hepatoprotetor, reduzindo danos ao DNA, exibindo papel protetor na via antioxidante ao alterar as atividades de SOD, CAT e GST; regulando negativamente TNFα, COX-2 e iNOS e aumentando a IL-10 (Fernandes et al., 2021).

Em modelo de lesão renal crônica com camundongos C57BL/6 tratados com ômega-3 durante 7 dias foi demonstrado menor estresse oxidativo, inflamação e fibrose em comparação com os camundongos não tratados (Han et al., 2023). E já foi demonstrado que os derivados do ômega-3, maresinas e protectinas diminuem a inflamação e protegem o rim na lesão renal aguda (Hong et al., 2013). Em modelo de lesão renal aguda associada à sepse, o pré-tratamento com maresia-1, um mediador lipídico derivado do DHA, reduziu a produção de malondialdeído e melhorou a atividade da superóxido dismutase dos tecidos renais, ao mesmo tempo em que inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e protegeu as mitocôndrias (Li et al., 2021).

Em um ensaio clínico com pacientes em hemodiálise que receberam 3g de ômega-3 durante 2 meses, observou-se aumento nas enzimas antioxidantes SOD e GPx e redução na lipoperoxidação indicando uma melhora no estado antioxidante dos pacientes em hemodiálise (Tayyebi-Khosroshahi et al., 2010).

Os ácidos graxos poli-insaturados atuam como antioxidantes quando são inseridos nas membranas celulares e regulam as vias de sinalização antioxidante. Membranas mitocondriais das células eucarióticas têm um alto teor de DHA, indicando que o DHA é um fosfolipídio fundamental para síntese de adenosina trifosfato (ATP) por fosforilação oxidativa. Nas mitocôndrias, o DHA atua reduzindo o estresse oxidativo e a atividade da citocromo-c oxidase (complexo IV), bem como aumenta a atividade da SOD dependente de manganês (Mn-SOD) (Li et al., 2019; Oppedisano et al., 2020).

O efeito protetor do ômega-3 em doença cardiovascular é bem conhecido e a suplementação dietética demonstrou reduzir a disfunção mitocondrial relacionada ao estresse oxidativo e apoptose de células endoteliais, um efeito que ocorre através de um aumento da atividade das enzimas antioxidantes endógenas (Oppedisano et al., 2020).

Outro achado importante em nosso estudo foi a redução dos metabólitos do óxido nítrico no tecido renal dos animais tratados com ômega-3. O óxido nítrico (NO) é considerado uma molécula que apresenta certa ambiguidade, podendo atuar de forma benéfica, conferindo vasodilatação ou de forma prejudicial em situações de estresse oxidativo e deficiência no sistema antioxidante (Radi, 2018).

Em nossa pesquisa, evidenciamos um aumento significativo nos metabólitos do NO no tecido renal dos animais cirróticos e o ômega-3 atenuou a produção de NO nos animais tratados, o que evidencia um efeito antioxidante da suplementação de ômega-3. Esse efeito também foi observado por Bosco e colaboradores (2012) no tecido pulmonar de animais cirróticos no modelo de síndrome hepatopulmonar quando tratados com melatonina. No entanto, pelo óxido nítrico conferir papéis distintos no metabolismo, alguns estudos evidenciam o aumento da síntese de NO após a utilização de ômega-3 (Yuan et al., 2020; Sherratt et al., 2021).

Sabe-se que um aumento no estresse oxidativo induz disfunção endotelial, uma vez que as EROs reduzem a biodisponibilidade de NO e aumentam a síntese de espécies oxidativas mais tóxicas, ou seja, o peroxinitrito (Münzel et al., 2017). Na cirrose, a presença da hipertensão portal aumenta a liberação de NO através do aumento da expressão e atividade do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a vasoconstrição renal, própria da SHR, também aumenta o conteúdo do NO proveniente da ativação da iNOS. Nessa condição o aumento nos níveis de NO está diretamente relacionado com o dano oxidativo nos tecidos decorrentes da formação do peroxinitrito (Anavi; Tirosh, 2020).

A suplementação com ômega-3 foi capaz de reduzir os níveis de NO no tecido renal e com isso diminuir os danos do estresse nitrosativo. Por outro lado, o ômega-3 estimula a expressão e atividade do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e esse é um dos efeitos importantes da ação protetora cardiovascular exercida pelo ômega-3. Além disso, o EPA determina uma maior síntese de NO por aumentando a ativação da eNOS induzida pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e a dissociação da eNOS da proteína de estrutura inibitória caveolina. A atividade da eNOS também é estimulada pelo DHA que favorece a ligação entre a eNOS e a proteína de choque térmico 90 (HSP-90), com ativação do Via PKB/AKt (Zanetti et al., 2015; Lamoke et al., 2015).

O efeito protetor do ômega-3 em doenças cardiovasculares já é bem descrito. A suplementação dietética com ômega-3 demonstrou reduzir a disfunção

mitocondrial relacionada ao estresse oxidativo e apoptose de células endoteliais, um efeito que ocorre através de um aumento da atividade das enzimas antioxidantes endógenas. Além disso, foi demonstrado que os ácidos graxos poli-insaturados n-3 neutralizam a liberação de substâncias pró-inflamatórias como citocinas nos tecidos vasculares e no miocárdio, restaurando a reatividade vascular e desempenho miocárdico (Oppedisano et al., 2020).

O tratamento com ômega-3 também foi capaz de diminuir o índice de dano ao DNA avaliado pelo ensaio cometa no tecido renal, inibir a expressão da caspase-9 e aumentar a viabilidade celular no rim dos animais cirróticos tratados.

O pré-tratamento com DHA em macrófagos derivados da medula óssea estimulados por LPS bloqueou a ativação da caspase-1 e a secreção de IL-1b (Yan et al., 2013). O tratamento com EPA também foi capaz de reduzir o dano oxidativo e a expressão da caspase-9 e caspase-3 em modelo de lesão renal diabética em camundongos (Taneda et al., 2010). Em modelo de lesão renal por vancomicina, a utilização de DHA foi capaz de inibir o estresse oxidativo e inativar as vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que foi associada à regulação positiva de Bcl-2 e regulação negativa de caspase-9, caspase-3, citocromo-c, p38 e JNK (Shi et al., 2018).

Em modelo de lesão hepática por valproato, o tratamento com DHA preveniu a apoptose hepatocelular através da redução da expressão da caspase-9 clivada e do número de hepatócitos positivos pela técnica de TUNEL (El-Mowafy et al., 2016). A caspase-9 atua como um gatilho apoptótico estimulada por fatores como NOX/ROS, ERK1/2 ou COX-2 que no tecido hepático levam à lesão oxidativa e inflamatória. O ômega-3, além do importante efeito antioxidante, é capaz de aumentar a prostaglandina E3, anti-inflamatória, e inibir IL-1b e TNF-a, além de regular negativamente a MAPK e ERK e com isso diminuir a inflamação e a apoptose (El-Mowafy et al., 2016).

A utilização dos metabólitos bioativos derivados do EPA e do DHA como maresinas, resolvinas e protectinas tem demonstrado resultados promissores na melhora de muitas doenças inflamatórias (Beyer et al., 2023). Em modelo de lesão renal aguda associada à sepse, o pré-tratamento com maresia-1, um mediador lipídico derivado do DHA, inibiu a expressão de BAX e da caspase-3 clivada, enquanto aumentou a expressão de BCL-2 nos tecidos renais. Esse efeito parece

ocorrer através da inibição da via de sinalização NOX4/ROS/NF-κB p65 (Li et al., 2021).

Maresin-1 também foi capaz de melhorar a inflamação, reduzir áreas necróticas e aumentar a proliferação celular, avaliada pelo índice de atividade mitótica e pela expressão de Ki-67 em fígados de animais DHGNA (Rodríguez et al., 2021). O pré-tratamento com resolvina D1 (RvD1), outro mediador lipídico derivado do DHA, atenuou a apoptose induzida pelo estresse do retículo endoplasmático e também diminuiu a atividade da caspase 3 em células HepG2, efeito mediado através da via da JNK (Jung et al., 2014).

Em resumo, a utilização do tratamento com ômega-3 durante duas semanas em animais cirróticos a partir do 12º dia da LDB mostrou efeitos protetores sobre o tecido renal, pois demonstramos um efeito antioxidante através da redução na formação de ERO, diminuição da lipoperoxidação medida por TBARS, diminuição nos metabólitos do óxido nítrico. Além disso, houve melhora do potencial eletroquímico mitocondrial e aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no rim dos animais cirróticos tratados. Também demonstramos a proteção do tecido renal com redução dos danos ao DNA, diminuição do apoptose e da morte celular nos animais com LDB e tratados com ômega-3.

Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que o ômega-3 protege o tecido renal através da melhora dos parâmetros de estresse oxidativo, inflamatório e protege do dano celular desencadeado pela cirrose no rim. Esse efeito protetor pode ser importante para a manutenção da integridade do tecido renal em pacientes com doença hepática avançada e que aguardam transplante de fígado.

CONCLUSÃO

A síndrome hepatorrenal (SHR) é uma das principais causas de insuficiência renal aguda no indivíduo acometido com doenças hepáticas avançadas. Poucos estudos retratam os efeitos da suplementação de ácidos graxos do tipo ômega-3 e a melhora da doença e seu prognóstico.

Neste artigo avaliamos o estresse oxidativo no rim de animais com cirrose biliar secundária e mostramos que houve aumento nas ERO no tecido renal, aumento da lipoperoxidação medida pelas substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico e redução do potencial eletroquímica mitocondrial. Além disso, nos

animais cirróticos houve diminuição na atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase no rim. O tratamento com ômega-3 (1g/Kg de peso) durante duas semanas foi capaz de reduzir a produção de ERO e a lipoperoxidação, aumentar o potencial eletroquímica mitocondrial e a atividade das enzimas CAT e SOD.

Também avaliamos os níveis de óxido nítrico no tecido renal e observamos um aumento nos animais cirróticos que foi restaurado aos níveis do controle após o tratamento com ômega-3.

O modelo de ligadura de ducto biliar provocou, no tecido renal, danos ao DNA, aumento no apoptose de morte celular. O tratamento com ômega-3 durante duas semanas nos animais cirróticos foi capaz de reduzir o dano ao DNA, inibir a apoptose e melhorara a viabilidade celular.

Sugere-se que novos estudos sejam realizados a fim de aprofundar os conhecimentos sobre a ação do ômega-3 e seus metabólitos ativos na proteção antioxidante, anti-inflamatória e como coadjuvante no tratamento da SHR.

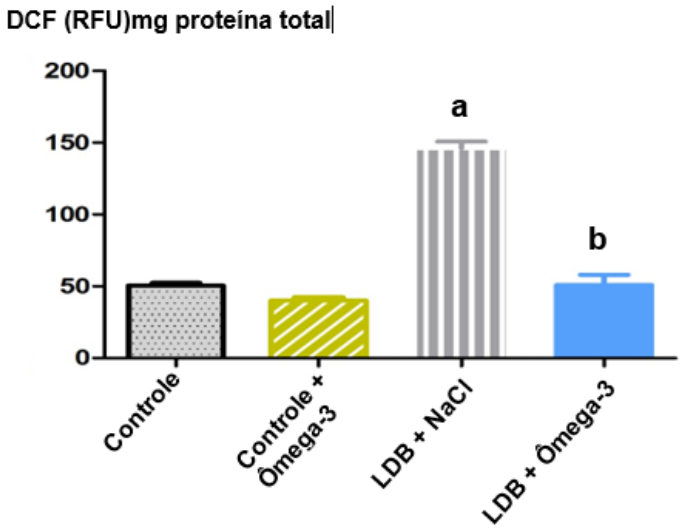

FIGURA 1. Valores referentes à produção de espécies reativas de oxigênio utilizando a reação com Diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA).
a representa uma diferença significativa do grupo controle
b representa uma diferença significativa do LDB mais NaCl ($p<0,05$; ANOVA one way seguida de Tukey).

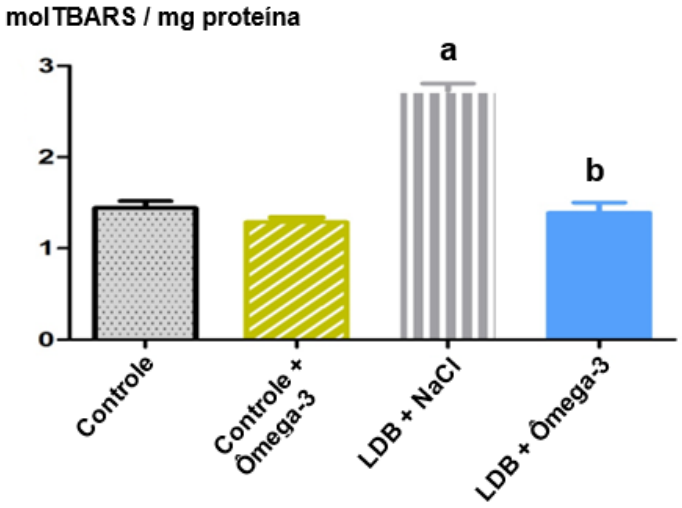

FIGURA 2. Valores referentes ao dano oxidativo em membranas aferido através da técnica TBARS.

a representa uma diferença significativa do grupo controle

b representa uma diferença significativa do LDB mais NaCl ($p<0,05$; ANOVA one way seguida de Tukey).

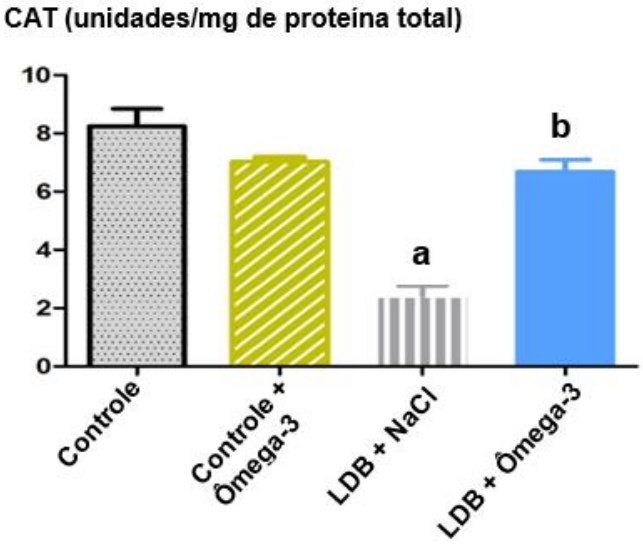

FIGURA 3. Valores referentes à atividade da enzima catalase (CAT).

a representa uma diferença significativa do grupo controle

b representa uma diferença significativa do LDB mais NaCl ($p<0,05$; ANOVA one way seguida de Tukey).

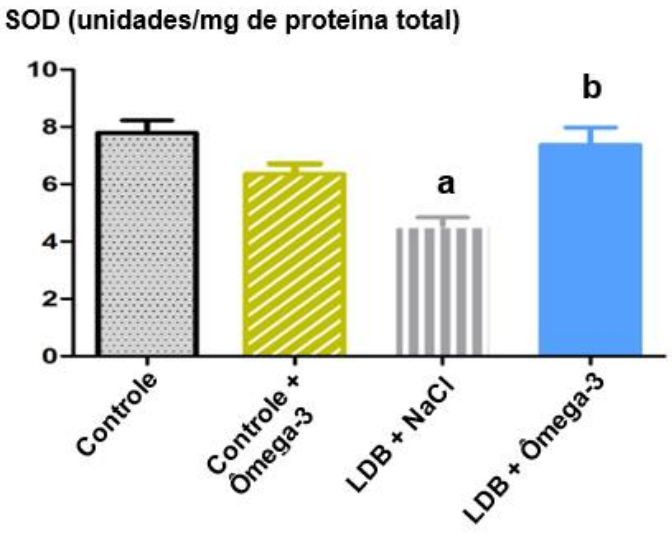

FIGURA 4. Valores referentes à dosagem da enzima Superóxido Dismutase (SOD).
a representa uma diferença significativa do grupo controle
b representa uma diferença significativa do LDB mais NaCl ($p<0,05$; ANOVA one way seguida de Tukey).

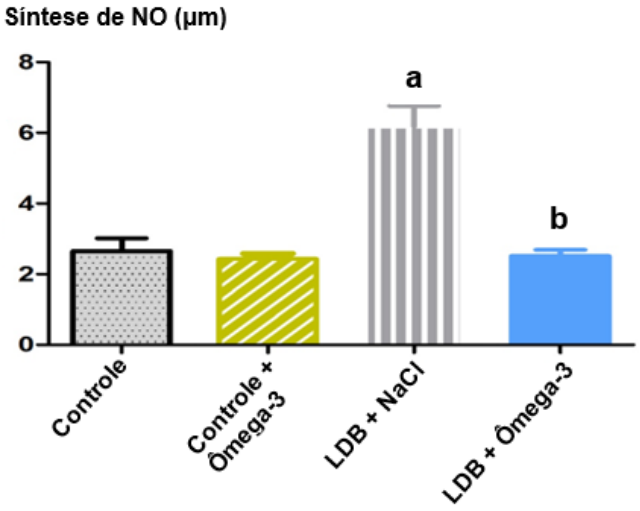

FIGURA 5. Valores referentes à produção de óxido nítrico (NO).
a representa uma diferença significativa do grupo controle
b representa uma diferença significativa do LDB mais NaCl ($p<0,05$; ANOVA one way seguida de Tukey).

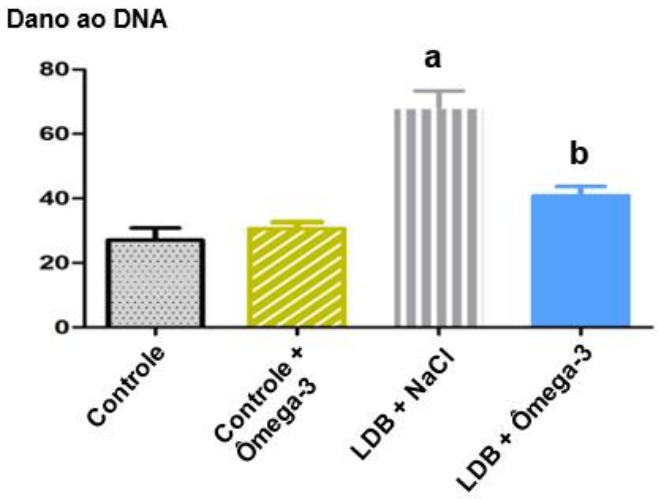

FIGURA 6. Valores referente ao efeito protetor ao DNA desempenhado pela utilização de ômega-3.

a representa uma diferença significativa do grupo controle

b representa uma diferença significativa do LDB mais NaCl ($p<0,05$; ANOVA one way seguida de Tukey).

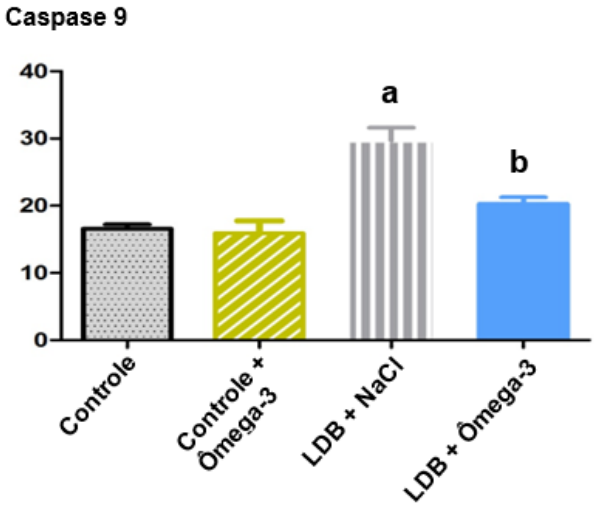

FIGURA 7. Valores referente à síntese de Caspase 9 (CASP 9).

a representa uma diferença significativa do grupo controle

b representa uma diferença significativa do LDB mais NaCl ($p<0,05$; ANOVA one way seguida de Tukey).

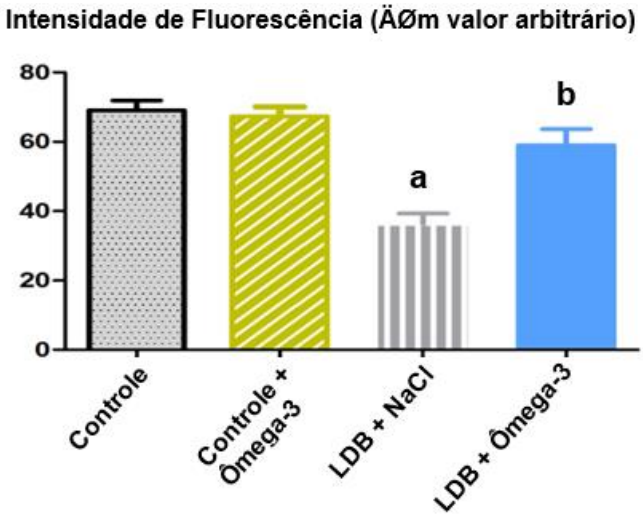

FIGURA 8. Valores referentes ao potencial eletroquímico mitocondrial.
a representa uma diferença significativa do grupo controle
b representa uma diferença significativa do LDB mais NaCl (p<0,05; ANOVA one way seguida de Tukey).

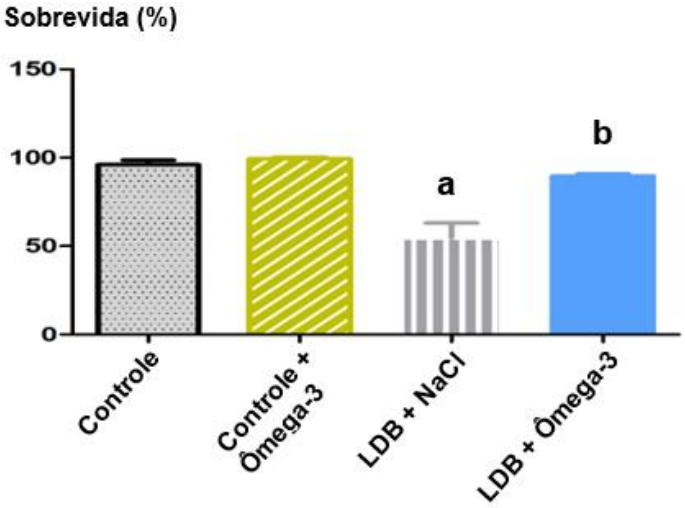

FIGURA 9. Valores referentes á sobrevida dos animais tratados com ômega-3.
a representa uma diferença significativa do grupo controle
b representa uma diferença significativa do LDB mais NaCl (p<0,05; ANOVA one way seguida de Tukey).

REFERÊNCIAS

Anavi S, Tirosh O. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. Free Radic Biol Med. 2020 Jan;146:16-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.411. Epub 2019 Oct 28. PMID: 31672462.

Angeli P et al. News in pathophysiology, definition and classification of hepatorenal syndrome: A step beyond the International Club of Ascites (ICA) consensus document. J Hepatol. 2019 Oct;71(4):811-822. doi: 10.1016/j.jhep.2019.07.002. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31302175.

Beyer MP et al. Potential Clinical Applications of Pro-Resolving Lipids Mediators from Docosahexaenoic Acid. Nutrients. 2023 Jul 26;15(15):3317. doi: 10.3390/nu15153317. PMID: 37571256; PMCID: PMC10421104.

Bona S et al. Melatonin restores zinc levels, activates the Keap1/Nrf2 pathway, and modulates endoplasmic reticular stress and HSP in rats with chronic hepatotoxicity. World J Gastrointest Pharmacol Ther 2022; 13(2): 11-22 [PMID: 35433098 DOI: 10.4292/wjgpt.v13.i2.11]

Bosco AD et al. Effects of melatonin on liver and lung tissues of animals with bile duct ligation-induced hepatopulmonary syndrome. J Pulmonol Respir Res. 2021; 5: 097-105.

Byrne CD et al. Tests for diagnosing and monitoring non-alcoholic fatty liver disease in adults. BMJ. 2018 Jul 12;362:k2734. doi: 10.1136/bmj.k2734. PMID: 30002017.

Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. Biochim Biophys Acta. 2015 Apr;1851(4):469-84. doi: 10.1016/j.bbalip.2014.08.010. Epub 2014 Aug 20. PMID: 25149823.

Calder, P.C. n-3 PUFA and inflammation: From membrane to nucleus and from bench to bedside. Proc. Nutr. Soc. 2020, 79, 404–416.

Colares JR et al. Melatonin prevents oxidative stress, inflammatory activity, and DNA damage in cirrhotic rats. World J Gastroenterol 2022; 28(3): 348-364 [PMID: 35110954 DOI: 10.3748/wjg.v28.i3.348]

Collins AR et al. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. Mut Res 1995;336 69-77.

Djuricic I, Calder PC. Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. Nutrients. 2021 Jul 15;13(7):2421. doi: 10.3390/nu13072421. PMID: 34371930; PMCID: PMC8308533.

Djuricic ID et al. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid dietary recommendations are moderately efficient in optimizing their status in healthy middle-aged subjects with low fish consumption:A cross-over study. Nutr. Res. 2014, 34, 210–218.

El-Mowafy AM et al. Novel molecular triggers underlie valproate-induced liver injury and its alleviation by the omega-3 fatty acid DHA: role of inflammation and apoptosis. Heliyon. 2016 Jul 1;2(7):e00130. doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00130. PMID: 27441301; PMCID: PMC4946287.

Emadi A et al. Analytic validity of genetic tests to identify factor V Leiden and prothrombin G20210A. Am J Hematol. 2010 Apr;85(4):264-70. doi: 10.1002/ajh.21617. PMID: 20162544.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol 1990;186 407-421.

Fernandes JC et al. Combination of Trans-Resveratrol and ε-Viniferin Induces a Hepatoprotective Effect in Rats with Severe Acute Liver Failure via Reduction of Oxidative Stress and MMP-9 Expression. Nutrients 2021; 13, 3677. https://doi.org/10.3390/nu13113677

Giacobbe J et al. The anti-inflammatory role of omega-3 polyunsaturated fatty acids metabolites in pre-clinical models of psychiatric, neurodegenerative and neurological disorders. Front. Psychiatry 2020;11, 122.

Ginès P et al. Hepatorenal syndrome. Nat Rev Dis Primers. 2018; 4:23

Greg M. Cole et al. Omega-3 fatty acids and dementia, Han S, Choi H, Park H, Kim JJ, Lee EJ, Ham YR, Na KR, Lee KW, Chang YK, Choi DE. Omega-3 Fatty Acids Attenuate Renal Fibrosis via AMPK-Mediated Autophagy Flux Activation. Biomedicines. 2023 Sep 17;11(9):2553. doi: 10.3390/biomedicines1 1092553. PMID: 37760994; PMCID: PMC10525956.

Hong S, Lu Y. Omega-3 fatty acid-derived resolvins and protectins in inflammation resolution and leukocyte functions: targeting novel lipid mediator pathways in mitigation of acute kidney injury. Front Immunol. 2013 Jan 30;4:13. doi: 10.3389/fimmu.2013.00013. PMID: 23386851; PMCID: PMC3558681.

Howe PRC et al. Effects of long chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Brain function in mildly hypertensive older adults. Nutrients. 2018;10(1413):1-14.

Jump DB et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as a treatment strategy for nonalcoholic fatty liver disease. Pharmacol Ther. 2018 Jan;181:108-125. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.07.007. Epub 2017 Jul 16. PMID: 28723414; PMCID: PMC5743581.

Jung TW et al. Resolvin D1 reduces ER stress-induced apoptosis and triglyceride accumulation through JNK pathway in HepG2 cells. Mol Cell Endocrinol. 2014 Jun 25;391(1-2):30-40. doi: 10.1016/j.mce.2014.04.012. Epub 2014 Apr 28. PMID: 24784707.

Kamath BM et al. Outcomes of Childhood Cholestasis in Alagille Syndrome: Results of a Multicenter Observational Study. Hepatol Commun. 2020 Jan 22;4(3):387-398. doi: 10.1002/hep4.1468. PMID: 33313463; PMCID: PMC7049675.

KD Kochanek et al. Mortality in the United States, 2016. NCHS Data Brief. 2017;(293):1-8.

Kountouras Jannis et al. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. Br. J. exp. Path. 1984;(65):305-311.

Kromann N et al. Epidemiological Studies in the Upernavik District, Greenland. Acta Medica Scandinavica, 1980;208: 401-406. https://doi.org/10.1111/j .0954-6820.1980.tb01221.x

Kuan-Pin Su et al. Omega-3 fatty acids as a psychotherapeutic agent for a pregnant schizophrenic patient, European Neuropsychopharmacology, Volume 11, Issue 4, 2001, Pages 295-299, ISSN 0924-977X.

Kulkarni AV et al. Omega-3 fatty acid lipid emulsions are safe and effective in reducing endotoxemia and sepsis in acute-on-chronic liver failure: An open-label randomized controlled trial. J Gastroenterol Hepatol. 2021 Jul;36(7):1953-1961. doi: 10.1111/jgh.15400. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33450081.

Lamoke F et al. Amyloid β peptide-induced inhibition of endothelial nitric oxide production involves oxidative stress-mediated constitutive eNOS/HSP90 interaction and disruption of agonist-mediated Akt activation. J. Neuroinflammation. 2015, 3, 12–84. [CrossRef]

Larsson SC et al. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. Am J Clin Nutr. 2004 Jun;79(6):935-45. doi: 10.1093/ajcn/79.6.935. PMID: 15159222.

Li D et al. Ômega 6 to omega 3 fatty acid imbalance early in life leads to persistent reductions in DHA levels in glycerophospholipids in rat hypothalamus even after long-term omega 3 fatty acid repletion. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2006 Jun;74(6):391-9. doi: 10.1016/j.plefa.2006.03.010. Epub 2006 May 23. PMID: 16716580

Li J et al. Maresin 1 Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury via Inhibiting NOX4/ROS/NF-κB Pathway Frontiers in Pharmacology 12, 2021.

Li R.; Jia Z., Zhu H. Regulation of Nrf2 Signaling. React. Oxyg. Species (Apex) 2019, 8, 312–322. [CrossRef]

Maehly AC, Chance B. The assay of catalases and peroxidases. Methods Biochem Anal. 1954;1:357-424. doi: 10.1002/9780470110171.ch14. PMID: 13193536.

Mattiello A et al. Evidence of Phytotoxicity and Genotoxicity in Hordeum vulgare L. Exposed to CeO2 and TiO2 Nanoparticles. Front Plant Sci 6 1043.

Miles EA, Calder PC. Effects of Citrus Fruit Juices and Their Bioactive Components on Inflammation and Immunity: A Narrative Review. Front. Immunol. 2021;12:712608. doi: 10.3389/fimmu.2021.712608

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase J Biol Chem 1972;247, 3170-3175.

Münzel T et al. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature Part 2 of a 3-Part Series. J. Am. Coll. Cardiol. 2017, 70, 212–229. [CrossRef] [PubMed]

Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. J Histochem Cytochem 2001;49:1183-1186.

Ojeda-Yuren AS et al. An Integrated Review of the Hepatorenal Syndrome. Ann Hepatol. 2021 May-Jun;22:100236. doi: 10.1016/j.aohep.2020.07.008. Epub 2020 Aug 23. PMID: 32846202.

Oppedisano F et al. The anti-inflammatory and antioxidant properties of n-3 PUFAs: Their role in cardiovascular protection. Biomedicines 2020, 8, 306.

Pereira RM et al. Development of hepatorenal syndrome in bile duct ligated rats. World J Gastroenterol. 2008;14(28):4505-11.

Prener A et al. Genital Anomalies and Risk for Testicular Cancer in Danish Men. Epidemiology, 1996;7(1): 14–19.

Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Jun 5;115(23):5839-5848. doi: 10.1073/pnas.1804932115. Epub 2018 May 25. PMID: 29802228; PMCID: PMC6003358.

Rodríguez MJ et al. Maresin-1 Prevents Liver Fibrosis by Targeting Nrf2 and NF-κB, Reducing Oxidative Stress and Inflammation. Cells. 2021 Dec 3;10(12):3406. doi: 10.3390/cells10123406. PMID: 34943914; PMCID: PMC8699629.

Russ KB et al. Acute kidney injury in patients with cirrhosis . J Clin Transl Hepatol. 2015, 3:195-204.

Scorletti E, Byrne CD. Omega-3 fatty acids and non-alcoholic fatty liver disease: Evidence of efficacy and mechanism of action. Mol Aspects Med. 2018 Dec;64:135-146. doi: 10.1016/j.mam.2018.03.001. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29544992.

Scorletti E et al. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in nonalcoholic fatty liver disease: Results from the WELCOME* study. Hepatology, 2014;60: 1211-1221. https://doi.org/10.1002/ hep.27289

Shahidi F, Ambigaipalan P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. Annu Rev Food Sci Technol. 2018 Mar 25;9:345-381. doi: 10.1146/annurev-food-111317-095850. PMID: 29350557.

Sherratt SCR et al. Role of Omega-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease: the Debate Continues. Curr Atheroscler Rep. 2023 Jan;25(1):1-17. doi: 10.1007/s11883-022-01075-x. Epub 2022 Dec 29. PMID: 36580204; PMCID: PMC9834373.

Shi H et al. Protective Effects of DHA-PC against Vancomycin-Induced Nephrotoxicity through the Inhibition of Oxidative Stress and Apoptosis in BALB/c Mice. J Agric Food Chem. 2018 Jan 17;66(2):475-484. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04565. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29254330.

Silveira KC et al.Cirrhosis induces apoptosis in renal tissue through intracellular oxidative stress. Arq Gastroenterol. 2015;52:65-71

Silveira KCS et al.Cirrhosis induces apoptosis in renal tissue through intracellular oxidative stress. Arq Gastroenterol [Internet]. 2015 Jan;52(1):65–71. Available from: https://doi.org/10.1590/S0004-28032015000100014

Simonetto DA et al.Hepatorenal syndrome: pathophysiology, diagnosis, and management . BMJ. 2020.

Singh NP et al.A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988 Mar;175(1):184-91. doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0. PMID: 3345800.

Spooner MH, Jump DB. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Omega-3 Fatty Acids: Mechanisms and Clinical Use. Annu Rev Nutr. 2023 Aug 21;43:199-223. doi: 10.1146/annurev-nutr-061021-030223. Epub 2023 May 19. PMID: 37207355.

Stefanello et al. Analysis of consumption of omega 3 source foods by participants of social groups. Revista Brasileira De Geriatria E Gerontologia, 2019;22(6), e190287. https://doi.org/10.1590/1981-22562019022.190287

Su KP et al. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. Eur Neuropsychopharmacol. 2003 Aug;13(4):267-71. doi: 10.1016/s0924-977x(03)00032-4. Erratum in: Eur Neuropsychopharmacol. 2004 Mar;14(2):173. PMID: 12888186.

Sumida W et al. Oral administration of eicosapentaenoic acid suppresses liver fibrosis in postoperative patients with biliary atresia. Pediatr Surg Int. 2018 Oct;34(10):1059-1063. doi: 10.1007/s00383-018-4313-6. Epub 2018 Jul 28. PMID: 30056480.

Taneda S et al.Eicosapentaenoic acid restores diabetic tubular injury through regulating oxidative stress and mitochondrial apoptosis. Am J Physiol Renal Physiol. 2010 Dec;299(6):F1451-61. doi: 10.1152/ajprenal.00637.2009. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20844021.

Tayyebi-Khosroshahi H, Houshyar J, Tabrizi A, Vatankhah AM, Razzagi Zonouz N, Dehghan-Hesari R. Effect of omega-3 fatty acid on oxidative stress in patients on hemodialysis. Iran J Kidney Dis. 2010 Oct;4(4):322-6. PMID: 20852375.

Vell MS et al.. Omega-3 intake is associated with liver disease protection. Front Public Health. 2023 Jul 19;11:1192099. doi: 10.3389/fpubh.2023.1192099. PMID: 37538264; PMCID: PMC10394692.

Viau CM et al. The natural triterpene 3β,6β,16β-trihydroxy-lup-20(29)-ene obtained from the flowers of Combretum leprosum induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. BMC Complement Altern Med 2014;14(280).

Videla LA et al.Influence of the nutritional status and oxidative stress in the desaturation and elongation of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: Impact on non-alcoholic fatty liver disease. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2022 Jun;181:102441. doi: 10.1016/j.plefa.2022.102441. Epub 2022 Apr 22. PMID: 35537354.

Wang M et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids for the management of alcoholic liver disease: A critical review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2019;59(sup1):S116-S129. doi: 10.1080/10408398.2018.1544542. Epub 2018 Dec 22. PMID: 30580553.

Wang T et al. Association Between Omega-3 Fatty Acid Intake and Dyslipidemia: A Continuous Dose-Response Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. J Am Heart Assoc. 2023 Jun 6;12(11):e029512. doi: 10.1161/JAHA.123.029512. Epub 2023 Jun 2. PMID: 37264945; PMCID: PMC10381976.

Mozaffarian D et al. American Heart Association Statistics Committee; Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2016 Jan 26;133(4):e38-360. doi: 10.1161/CIR.0000000000000350. Epub 2015 Dec 16. Erratum in: Circulation. 2016 Apr 12;133(15):e599. PMID: 26673558.

Wu HHL et al.Exfoliated Kidney Cells from Urine for Early Diagnosis and Prognostication of CKD: The Way of the Future? Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 7610. https://doi.org/10.3390/ijms23147610

Yan L et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. Nat Struct Mol Biol. 2013 Sep;20(9):1131-9. doi: 10.1038/nsmb.2660. Epub 2013 Aug 11. PMID: 23934149.

Yang J et al. Oxidative Stress and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation. Nutrients. 2019; 11(4):872. https://doi.org/10.3390/nu11040872

Zanetti M et al. N-3 PUFAs Polyunsaturated Fatty Acids: Structural and Functional Effects on the Vascular Wall. BioMed Res. Int. 2015, 2015, 791978. [CrossRef]

7 CONCLUSÃO

O estudo apresentou que a suplementação de ômega-3 de forma complementar ao tratamento medicamentoso tradicionalmente empregado no manejo da síndrome hepatorrenal em pacientes cirróticos, pode contribuir para a melhora do percurso da doença, tendo em vista os resultados apresentados bem como de outros estudos já realizados. No entanto, a execução de outros estudos se faz necessária para uma melhor compreensão da atuação e dos mecanismos desempenhados quanto ao uso de ômega-3 frente ao quadro clínico da SHR.

8 ANEXOS

Carta de encaminhamento do artigo científico para a revista *World Journal of Nephrology.*

Thank you for submitting your manuscript to World Journal of Nephrology, a peer-reviewed, online, and open access journal. We are pleased to inform you that one of the peer reviewers has completed his/her re-review of your manuscript.

1 Details of your submission

Journal title: World Journal of Nephrology

Manuscript NO: 95627

Title: Protective effect of long-chain polyunsaturated fatty acids on the hepatorenal syndrome in rats

Authors: João Bruno Beretta, Cassiana Macagnan Viau, Jenifer Saffi, Sabrina Alves Fernandes and Marilene Porawski

Received Date: 2024-04-14

Date sent for review: 2024-06-18

Date reviewed: 2024-06-20

Reviewer ID: 05742562

Review time: 2 Days

Correspondence To: Marilene Porawski, PhD, Adjunct Professor, Basic Health Sciences, UFCSPA, Rua Sarmento Leite, 245/308C, Porto Alegre 90050-170, Brazil. marilenep@ufcspa.edu.br

2 Peer-review report

Reviewer #1:

The revised manuscript has substantially improved in terms of clarity, depth of discussion, and scientific justification. The authors have effectively addressed all the reviewers' comments, and the additions have enhanced the manuscript's overall quality. Given these improvements and the thorough responses to the reviewers, I recommend that the manuscript be accepted for publication in the World Journal of Nephrology. The study presents significant insights into the protective effects of long-chain polyunsaturated fatty acids in a relevant animal model of HRS, contributing valuable knowledge to the field. Thank you for considering my recommendation. I look forward to the potential publication of this impactful research.

Reviewer #2:

Thank you for submitting your manuscript for consideration. After reviewing the manuscript, I would like to offer the following comments and suggestions for improvement: 1.Clarity on Animal Model Establishment: The manuscript lacks clarity on how the hepatorenal syndrome (HRS) model was successfully established in the cirrhotic rats. Please provide detailed information on the criteria or parameters used to confirm the induction of HRS in the animal model. This is crucial for the readers to understand the validity and reliability of the experimental model. 2.Inclusion of In Vivo and In Vitro Experimental Images: While the experimental content is rich, the results section appears to be lacking in visual evidence to support the findings. I recommend including relevant images, such as histopathological images of kidney tissues, cellular images demonstrating the effects of omega-3 supplementation on oxidative stress, and other relevant images to enhance the comprehensibility and credibility of the results. 3.Enhancement of Experimental Results: The experimental results appear to be somewhat limited considering the extensive experimental design. To strengthen the findings, please consider providing additional experimental data. Specifically, more detailed data on oxidative stress, nitric oxide metabolites, DNA damage by the comet assay, and apoptosis in the kidneys of the experimental groups would be beneficial. 4.Integration with Clinical Data: The study could be improved by integrating clinical data, which would provide a broader perspective and relevance to human hepatorenal syndrome. I suggest discussing how the findings from this animal study could potentially translate to clinical applications and benefit patients with HRS. Considering the above-mentioned issues, I recommend a major revision of the manuscript. After addressing these concerns, please resubmit the revised manuscript for further review. I look forward to receiving the updated version of your manuscript.

Besides, the peer review process requires 14 to 28 days or longer for each manuscript. Usually, our second decision regarding the acceptance or rejection of a manuscript is based on the comments of reviewers. We will hold a meeting each week to make the second decision of manuscripts. Once the second decision of your manuscript is made, we will notify you immediately by e-mail.

For the time being, your manuscript does not require any changes be made to it before the second decision will be made. You do not need to reply this e-mail, and we request that you await our further contact via e-mail about the decision for acceptance, revision, or rejection. Thank you for your cooperation!

If you have any questions, however, please feel free to contact us via e-mail at: editorialoffice@wjgnet.com or online at the Help Desk: http://www.f6publishing.com/helpdesk.

Best regards,

Editorial Office

Baishideng Publishing Group Inc

7041 Koll Center Parkway, Suite 160, Pleasanton, CA 94566, USA

Telephone: +1-925-399-1568

E-mail: editorialoffice@wjgnet.com

Help desk: https://www.f6publishing.com/helpdesk

Online Submission: https://www.f6publishing.com/

https://www.wjgnet.com

About Baishideng

Baishideng Publishing Group (*Baishideng*), founded on January 15, 1993, is a biomedical publishing company accredited by the Committee on Publication Ethics, editing and publishing more than 47 academic journals in Chinese and English. All of the *Baishideng*'s academic journals are published using an open access and single-blind external peer-review model, with some high-quality academic journals being included in the Science Citation Index Expanded, Emerging Sources Citation Index, MEDLINE, PubMed, PubMed Central, Scopus, *Reference Citation Analysis* (*RCA*), and other important databases. *Baishideng* relies on its industry leading *F6Publishing* system, which features functionalities covering the entire publication process, from manuscript submission to online publishing, including an article quality tracking system, author evaluation system, and reader evaluation system. In addition, *Baishideng* has the world's only *RCA* system, an open and transparent high-quality academic article evaluation service platform for various categories that is freely available to authors and readers. The functions of *RCA* include Find an Article, Find a Category, Find a Journal, Find a Scholar, and Find an Academic Assistant.

--

Drª Marilene Porawski

Professora Associada III Fisiologia – Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Coordenadora de Mobilidade Acadêmica

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia

CV Lattes: http://lattes.cnpq.br/1828477861874579

+55 51 3303 8751

www.ufcspa.edu.br

Artigo em Língua Inglesa

Jomeurnal: *World Journal of Nephrology*

Manuscript Type: ORIGINAL ARTICLE

Number ID: 03765203

Basic Study

Protective effect of long-chain polyunsaturated fatty acids on the hepatorenal syndrome in rats.

Running Title: Dualibe JBBA *et al*. Translational model of hepatorenal syndrome in Wistar rats.

Na of

João Bruno B de Almeida Duailibe, Sabrina Alves Fernandes, Marilene Porawski
Programa de Pós-Graduação em Hepatologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

Cassiana M Viau, Jenifer Saffi
Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

Marilene Porawski
Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

João Bruno B de Almeida Duailibe - ORCID 0000-0001-8797-8682
Cassiana M. Viau - ORCID 0000-0002-6587-6033
Jenifer Saffi - ORCID 0000-0002-5372-2934
Sabrina Alves Fernandes - ORCID 0000-0001-8504-603X
Marilene Porawski - ORCID 0000-0003-3680-5815

Author contributions: Porawski M and Saffi J designed and coordinated the study; Duailibe JBBA, Viau CM, performed the experiments, acquired and analyzed data; Duailibe JBBA, Viau CM, Fernandes SA and Porawski M analyzed the data and wrote the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding: This research was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Corresponding author: Marilene Porawski, PhD, Senior Scientist, Department of Basic Sciences, UFCSPA, Porto Alegre, Brazil. marilenep@ufcspa.edu.br

Abstract

BACKGROUND

Hepatorenal syndrome (HRS) is the most prevalent form of acute kidney injury (AKI) in cirrhotic patients. It is characterized by reduced renal blood flow and represents the most severe complication in cirrhotic patients with advanced disease. Previous research has indicated that antioxidants can delay the onset of a hyperdynamic circulatory state in cirrhosis and improve renal function in HRS patients. Regular omega-3 supplementation has significantly reduced the risk of liver disease. This supplementation could represent an additional therapy for individuals with HRS.

AIM

We evaluated the antioxidant effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the kidneys of cirrhotic rats.

METHODS

Secondary biliary cirrhosis was induced in rats by biliary duct ligation (BDL) for 28 days. We used 24 male Wistar rats divided into the following groups: Group I (control); Group II (treated with omega-3, 1g/kg of body weight); Group III (BDL treated with omega-3, 1g/kg of body weight) and Group IV (BDL without treatment). The animals were euthanized by an overdose of an anesthetic; the kidneys were dissected, removed, frozen in liquid nitrogen, and stored in a freezer at -80^{o}C for later analysis. We evaluated oxidative stress, nitric oxide metabolites, DNA damage by the comet assay, cell viability test, and apoptosis in the kidney. Data were analyzed by one-way variance (ANOVA), and means were compared using the Tukey test, with $p \leq 0.05$.

RESULTS

Omega-3 significantly decreased the production of reactive oxygen species (ROS) ($p<0.001$) and lipoperoxidation in the kidneys of cirrhotic rats treated with omega-3 ($p<0.001$). The activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase increased in the BDL + omega group compared to the BDL group ($p<0.01$). Nitric oxide production, DNA damage, and caspase-9 cleavage decreased significantly in the omega-3-treated BDL group. There was an increase in mitochondrial electrochemical

potential ($p<0.001$) in BDL treated with omega-3 compared to BDL. No changes in the cell survival index in hepatorenal syndrome with omega-3 compared to the control group ($p>0.05$) were observed.

CONCLUSIONS

The study demonstrates that omega-3 can protect cellular integrity and function by increasing antioxidant enzymes, inhibiting the formation of free radicals, and reducing apoptosis.

Keywords: Long-chain polyunsaturated fatty acids; Antioxidant effect; Hepatorenal syndrome; Liver cirrhosis; Reactive oxygen species; Apoptosis

Core tip:

Hepatorenal syndrome is associated with a poor prognosis in individuals with advanced or decompensated cirrhosis. Palliative care involves the use of vasoconstrictor agents and intravenous albumin in combination. Currently, there are no effective treatments for this condition other than liver transplantation. Our research has shown that administering 1g/kg of omega-3 to cirrhotic rats reduced oxidative damage, DNA damage, and apoptosis while enhancing antioxidant defenses and maintaining the kidney's cellular integrity. These findings indicate that omega-3 supplementation could be complementary to managing hepatorenal syndrome.

INTRODUCTION

Cirrhosis is a complex disease characterized by necroinflammation and fibrogenesis of the liver caused by different mechanisms, such as drug-induced hepatotoxicity, hepatitis B or C infections, excessive alcohol consumption, primary metabolic diseases, obesity, non-alcoholic fatty liver disease, autoimmune diseases, cholestatic diseases, and iron or copper overload[1-3].

In the course of the disease, hepatocytes and collagen deposition are continuously destroyed, replacing healthy liver parenchyma with fibrotic tissue and regenerative nodules. These events cause a pronounced distortion of the hepatic vascular architecture, which results in increased resistance to portal blood flow and, therefore, portal hypertension, in addition to loss of liver function[3,4].

One of the main consequences in the advanced stage of cirrhosis is the development of hepatorenal syndrome (HRS), one of the most common types of kidney damage that

affects patients with severe and decompensated liver disease and is characterized by decreased renal perfusion and vasoconstriction[5-7].

Few studies have analyzed the effect of treatment with antioxidant substances on the kidneys of cirrhotic animals since there is a consensus that renal dysfunction in cirrhosis results from hemodynamic changes and the activation of compensatory hormonal mechanisms. Previous studies have already demonstrated that, although there are no detectable structural changes in the kidney tissue of cirrhotic animals that underwent BDL, there is a loss of integrity and cellular function in the kidney, with apoptosis, activation of caspase-3, oxidative damage to cell membranes and DNA damage[8].

BDL is a well-established model for cirrhosis development in 4 weeks after surgery. The cirrhosis observed in animals shows damage in the liver parenchyma, the presence of fibrosis, portal hypertension, and ascites[9,10]. These conditions, mainly the presence of portal hypertension, are what lead to renal changes, with systemic hypotension, reduced glomerular filtration, and activation of the renin-angiotensin-aldosterone system. These data are widely recorded in current scientific literature, allowing the BDL model to study the hepatorenal syndrome commonly seen in cirrhotic patients[11-15].

Omega-3 polyunsaturated fatty acids modulate the immune response by altering membrane phospholipids and preventing a pro-inflammatory state[16]. The benefit of omega-3 supplementation is well-established in cardiovascular risk protection, mainly due to the reduction in triglycerides and low-density lipoproteins (LDL) associated with omega-3 intake[17,18]. Other benefits regarding regular omega-3 intake are also reported, including a reduction in reactive oxygen species (ROS) and c-reactive protein (CRP), as well as the decreased release of cytokines and other inflammatory mediators[16,19].

Another factor directly related to HRS is portal hypertension, characterized by an excessive increase in portal venous pressure and the development of portosystemic collaterals, diverting portal blood flow to the systemic circulation. Several factors can trigger portal hypertension (PH); however, liver cirrhosis is the leading cause, comprising more than 90% of cases of PH. Among the main complications resulting from PH is upper gastrointestinal bleeding due to the rupture of gastroesophageal varices. Another less critical complication is the presence of ascites[20,21].

In liver diseases, some studies have reported a beneficial action of omega-3 polyunsaturated fatty acids, reducing sepsis and inflammatory markers in patients with severe acute hepatitis[22], reducing inflammation and fibrosis in patients with biliary atresia[23], and decreasing the percentage of fat liver in patients with NASH treated with purified docosahexaenoic acid (DHA)[24]. A significant reduction in the risk of liver disease, particularly NAFLD, has been demonstrated with regular omega-3 supplementation[19].

In this sense, regular use of omega-3 is closely related to preventing and reducing the severity of several diseases. Omega-3 fatty acids are found in the largest amounts in walnuts, flaxseed, chia, sardines, salmon, and tuna[25]. Omega-3 supplementation may represent an additional therapy for individuals affected by HRS since the effectiveness of vasoconstrictor and albumin treatment is limited to less than half of patients with HRS-AKI[7], and liver transplantation may not be a reality for all patients. However, little is known about the role of these fatty acids in patients with HRS, including the effects on the concentrations of inflammatory cytokines and the improvement in the disease's course.

This study aimed to investigate the effects of supplementation with omega-3 fatty acids on oxidative stress and apoptosis in the kidney tissue of cirrhotic animals treated with omega-3.

MATERIAL AND METHODS

Animals

All experimental procedures carried out on animals are by the recommendations of the Arouca Law (Law nº 11,794, of 10/08/2008) and were approved by the UFCSPA Ethics Committee with number 146/12. The animals were acclimatized to laboratory conditions (22±2°C, 12 h/12 h light/dark, 50% humidity, *ad libitum* access to food and water) for 2 wk before experimentation. Bile duct ligation was performed under anesthesia, and the animals received analgesia for 48 hours after surgery. Intragastric gavage administration was carried out with conscious animals, using straight gavage needles appropriate for the animal size. All animals were euthanized by an overdose of anesthetics.

In vivo studies

Twenty-four adult male Wistar rats with an average weight of 300g were used. Liver cirrhosis was induced by the bile duct ligation (BLD) model. Briefly, rats were anesthetized with 2% xylazine hydrochloride (50 mg/kg) and ketamine hydrochloride (100 mg/kg) (i.p.). Secondary biliary cirrhosis was induced in animals by double ligation and a total section of the common bile duct. The animals were sacrificed 28 days after obstruction, a time in which there is complete development of both cholestasis and fibrosis and clear establishment of the biochemical changes characteristic of liver cirrhosis[26]. Animals were divided into four (n=6): Group I

(control treated with saline), Group II (treated with omega 1g/kg/day), Group III (BDL treated with omega 1g/kg/day), and Group IV (BDL treated with saline) (Figure 1). Daily omega-3 supplementation began on the 14th day after BDL and continued for two weeks until the death of the animals on the 28th day after BDL.

Histological analysis

Five-micrometer sections of formalin-fixed and paraffin-embedded kidney slices were routinely processed with hematoxylin-eosin (performed by the Laboratory of Pathology at UFCSPA). A single pathologist, blinded to the experimental protocol, analyzed all kidney fragments using light microscopy.

Tissue and homogenate preparation

Animals were euthanized by an overdose of anesthetic. The frozen kidneys from each rat were homogenized in an ice-cold phosphate buffer and diluted in 10 volumes (1:10 w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 750 x g for 10 min at 4°C, the pellet was discarded, and the supernatant was immediately separated and used for the measurements.

Free radical levels

Homogenates were overlayed with 100 µL of 25 µM Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and placed back in the incubator for 30 min at 37°C. At the end of the incubation period, plates were removed, and the fluorescence of the homogenates was measured on a SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). The excitation/emission wavelengths for DCFDA were 480/520 nm. Relative fluorescence (RFU) values were expressed as RFU mg−1 protein[27].

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS, a measure of lipid peroxidation, was determined according to Esterbauer and Cheeseman (1990)[28]. Homogenates were mixed with 10 % trichloroacetic acid and 0.67 % thiobarbituric acid and heated in a water bath for 25 min. The absorbance determined TBARS at 535 nm. Results were reported as nmol of TBARS per mg protein.

Superoxide dismutase (SOD) assay

SOD activity was evaluated by quantifying the inhibition of superoxide-dependent autoxidation of epinephrine and verifying the absorbance of the samples at 480 nm[29]. Briefly, 20 µL of homogenate was added to 170 µL of a mixture containing 50 mM Glycine buffer pH 10.2 and 10 mM Catalase. After that, 10 µL of epinephrine was added, and the absorbance was immediately recorded every 30 s for 12 min at 480 nm in SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical

Technologies, Sunnyvale, California). The inhibition of autoxidation of epinephrine occurs in the presence of SOD, whose activity can then be indirectly assayed spectrophotometrically. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of epinephrine autoxidation, and the specific activity is reported as SOD Units/mg protein.

Catalase (CAT) assay

CAT activity was assayed according to the method described by Chance and Machley et al. (1954)[30], based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm. Briefly, 10 µL of homogenate was added to 180 µL of 20 mM Potassium phosphate buffer pH 7.2. Subsequently, 10 µL of 5 mM H_2O_2 was added, and the absorbance was immediately recorded every 30 s for 10 min using SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). One CAT unit is defined as one µmol of hydrogen peroxide consumed per minute, and the specific activity is calculated as CAT Units/mg protein.

Measurement of nitric oxide production

The production of nitric oxide (NO) was estimated by measuring the amount of nitrite, a stable metabolite of NO[31]. Briefly, 100 µL of homogenate was mixed with 100 µL of the Griess reagent (1% sulfanilamide; 0.1% naphthyl ethylenediamine; 2.5% H_3PO_4) at ambient temperature. After 20 min, absorbance was measured at 540 nm using SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). A nitrite calibration curve was used to convert absorbance to µM nitrite.

Alkaline Comet assay

The alkaline comet assay was performed as previously described (Singh, 1988)[32]. Briefly, 10 µL of cells were mixed with 90 µL LMP agarose, spread on a standard agarose precoated microscope slide, and placed at 4°C for 5 min to allow for solidification. Cells were lysed in high salt and detergent concentrations (2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris with 1% Triton X-100 and 10% DMSO freshly added) for 2 h. Slides were removed from the lysing solution and washed three times with PBS. Subsequently, cells were exposed to alkali conditions (300 mM NaOH/1 mM Na_2EDTA, pH >13, 30 min, 4°C) to allow DNA unwinding and expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 25 min at 25 V and 300 mA (94 V/cm). After electrophoresis, the slides were neutralized and silver-stained[33]. One hundred cells were scored visually according to the tail length and the amount of DNA in the tail. Each comet was given an arbitrary value of 0–4 (0, undamaged; 4, maximally damaged), as Collins et al. (1995)[34] described. Damage score was thus assigned to each sample and can range from 0 (completely undamaged: 100 cells X 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells X 4). International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method, as it highly correlates with computer-based image analysis[33,34].

Cell viability assay

Relative cell viability was determined by a trypan blue dye-exclusion assay (TBDE) employed as a cytotoxic measurement[8]. Trypan blue staining is a long-standing and widely used method to identify dead cells. Only cells with intact membranes can effectively exclude the dye, so dead cells with compromised membranes become stained. Homogenates were mixed with 0.4% trypan-blue solution for each group, which was then added. Cytotoxicity (the cellular growth inhibitory rate) was determined from the number of viable cells (no color) in treated samples as a percentage of the PBS control. We used the Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen). The test was carried out according to the manufacturer's instructions.

Assessment of apoptosis by flow cytometric analysis

Annexin V-PE was used with a vital dye, 7-AAD, to distinguish apoptotic (Annexin V-PE positive, 7-AAD negative) from necrotic (Annexin V-PE positive, 7-AAD positive) cells. After treatment, cells were collected and resuspended in 40 µL of binding buffer with 2 µL Annexin V-PE. Cells were incubated for 15 min in the dark at room temperature. After incubation, 160 µL of binding buffer and 2 µL of 7-AAD were added. Cells were incubated for 5 min, and an additional 200 µL of binding buffer was added. Before analysis, cells were filtered through a cell strainer cap fitted to a polystyrene round bottom flow cytometric tube. Data were collected and analyzed by a FACS Calibur flow cytometer with CellQuest software in a total of 10,000 events per sample; fluorescence was measured, and the percentage of viable, early apoptotic, late apoptotic, and necrotic cells was determined[35].

Quantification of cleaved caspase 9 by flow cytometric analysis

After treatment, cells were harvested and resuspended in 25 µL PBS and fixed with 4% formaldehyde. After permeabilization and blocking (0.2% Triton X-100 in PBS and 1% BSA), cells were incubated with the primary antibodies diluted 1:1000 for 1 h at room temperature, followed by incubation with anti-rabbit FITC secondary antibody at 1:1000 for 1 h at room temperature in the dark. Fluorescence intensity in arbitrary units was plotted in histograms, and the mean fluorescence intensity was calculated using CellQuest software.

Assay of the electrochemical potential

After treatment, cells were incubated with 2 mM Rh123 (rhodamine 123) for 30 minutes at 37° C, washed, and resuspended in 100 µL PBS. The mitochondrial electrochemical potential is correlated to the fluorescence intensity of Rho123 (with decreased fluorescence signifying loss of the mitochondrial electrochemical potential)[36]. Flow cytometry was performed using a FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, California, United States) with excitation at 488nm and emission read using a 525–550nm filter (FL1).

Protein determination

Protein was measured using the method of Lowry et al. (1951)[37] using bovine serum albumin as a standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and means were compared using the Tukey test, with $p \leq 0.05$ considered as statistically significant using GraphPad Prism version 5.0 Program (Intuitive Software for Science, São Diego, CA, USA). All data were expressed as mean ± standard error (SEM). All analyses were performed in duplicate. The statistical methods of this study were reviewed by the statistical office of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre - NUPESQ-UFCSPA (https://ufcspa.edu.br/pesquisa-e-inovacao/apoio-a-pesquisa/assessoria-estatistica).

RESULTS

Histological evaluation of the liver of animals with BDL showed a loss of typical architecture and the presence of regenerative nodules, cellular necrosis, and fibrosis (data not shown). No alterations in renal histology were observed in bile duct ligated rats compared to sham-operated animals, as shown in Figure 2.

The exclusion of structural kidney damage is a crucial component in HRS diagnosis. We did not perform other markers of renal function assessment, as the BDL model is widely accepted and validated for the experimental study of hepatorenal syndrome.

Initially, we investigated the effect of exposure to omega-3 on some parameters of oxidative stress in rat kidneys. As shown in Figure 3, omega-3 decreased ROS production significantly ($p<0.001$), and TBARS level was reduced by omega-3 ($p<0.001$) in hepatorenal syndrome.

We also observed an increase in mitochondrial electrochemical potential by omega-3 ($p<0.01$) in hepatorenal syndrome (Figure 4).
Regarding antioxidant enzymes (Figure 5), omega-3 increased SOD activity ($p<0.01$). Control plus omega-3 did not alter this enzyme's activity ($p>0.05$). CAT activity was significantly increased by omega-3 ($p<0.001$).
Figure 6 shows omega-3 inhibited NO production ($p<0.05$).

To assess the DNA damage, we performed an alkaline comet assay. Figure 7A shows that omega-3 significantly decreased DNA damage ($p<0.001$). No changes in hepatorenal syndrome omega-3 were observed compared to the control group ($p>0.05$).

Omega-3 treatment preserved cellular integrity in the kidneys of cirrhotic animals, as observed by cell viability determined by a trypan blue dye-exclusion assay (Figure 7B).

To delineate the mechanism of omega-3 after treatment, we monitored the caspase-9 activity (Figure 7C). Caspase-3 did not change at 1 h ($p>0.05$). Caspase-9 was decreased by omega-3 in hepatorenal syndrome ($p<0.001$).

DISCUSSION

Decompensated liver cirrhosis in an advanced stage is difficult to treat, as it affects several systems and organs, causing numerous complications such as portal hypertension, ascites, hepatic encephalopathy, spontaneous bacterial peritonitis, hepatorenal syndrome, among others[4]. In hepatorenal syndrome (HRS), deterioration of renal function is mainly caused by systemic circulatory dysfunction[3]. There is a significant constriction of the blood vessels that irrigate the kidneys due to splanchnic vasodilation, which increases central blood volume and interferes with renal reflex mechanisms in response to portal hypertension[7]. Hepatorenal syndrome is understood as a poor prognosis for liver disease patients, as it presents high mortality rates, especially in decompensated patients and non-candidates for liver transplantation[6,38].

The functional nature of hepatorenal syndrome means that improvement in renal function is expected with liver transplantation, which remains the optimal treatment of AKI-HRS whenever feasible. However, kidney recovery is not universal and depends on multiple factors, particularly the duration of kidney injury. In such cases, simultaneous liver-kidney transplantation is recommended rather than liver transplantation alone. Despite best efforts, almost 10% of patients with either acute kidney disease or chronic kidney disease who receive a liver alone may have persistent or progressive renal failure after transplant[7]. In this context, searching for complementary treatments that can protect the kidney from the damage caused by liver cirrhosis is essential to guarantee the quality of life of the post-transplant patient. The use of omega-3 polyunsaturated fatty acids has aroused researchers' interest in recent decades due to their various roles in treating and reducing the risk of diseases. The main types of omega-3 are eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), found in cold-water fish. Omega-3 can also be found in seeds and oilseeds, such as walnuts, chestnuts, flaxseeds, and sunflower seeds, in the form of linolenic acid (ALA), a precursor to the endogenous synthesis of EPA. and DHA. However, this bioconversion is limited[39]. Numerous studies have highlighted the benefits of using omega-3 in cardiovascular diseases[40], diabetes[41], immune system and inflammatory modulation[42], and neurodegenerative diseases[43].

In the present study, we used animal model rats subjected to bile duct ligation for 28 days, according to the protocol by Kountouras et al. (1984)[26], which allows the development of the clinical picture of secondary biliary cirrhosis triggered by the accumulation of bile in the liver parenchyma. In this model, from 4 weeks of BDL, it is possible to identify HRS characteristics with ascites, fluid imbalance, sodium retention, and increased creatinine[10]. Renal failure observed in the chronic BDL model shares pathophysiological similarities with HRS[44].

Animal models of human diseases are important tools for studying the cellular and molecular mechanisms involved and allow the possibility of using invasive methods and testing new therapies that would be unfeasible in human patients, whether for technical or ethical reasons. From this perspective, we inquire about the benefits of omega-3 supplementation in light of the complex and difficult-to-manage scenario that hepatorenal syndrome presents to patients affected by the disease.

In this model, we evaluated the effect of supplementation with 1g/Kg/day of omega-3 for 2 weeks from the 14th day of BDL on the kidney tissue of cirrhotic rats. We observed a significant reduction in markers of oxidative stress with a decrease in the production of reactive oxygen species, lipoperoxidation measured by substances that react with thiobarbituric acid (TBARS), improvement in mitochondrial dysfunction assessed by mitochondrial electrochemical potential, and an increase in the activity of superoxide antioxidant enzymes dismutase (SOD) and catalase (CAT).

Both EPA and DHA have a range of antioxidant and anti-inflammatory effects. Inflammation and oxidative stress are interrelated, and oxidative stress can activate inflammatory signaling pathways, while inflammation induces oxidative stress. Therefore, agents that act to reduce oxidative stress can also have anti-inflammatory action and vice versa[45].

In subjects with cirrhosis and portal hypertension, oxidative stress plays an essential role in the pathogenesis of several complications. These complications include hyperdynamic circulation, cirrhotic cardiomyopathy, and acute kidney injury/hepatorenal syndrome. Antioxidants can reverse or mitigate these processes and thus may have potential therapeutic effects on cardiovascular and renal abnormalities in cirrhosis[46].

Omega-3 polyunsaturated fatty acids can act as antioxidants and modulate inflammatory processes[47]. Intervention studies have demonstrated that increased intake of EPA + DHA results in increased concentrations of these fatty acids in cell membranes, which may be partly responsible for reducing membrane lipoperoxidation. Furthermore, they decrease the production of eicosanoids derived from arachidonic acid (AA)[25,48,49]. Increased omega-3 content is associated with reduced levels of other inflammatory markers, including several cytokines and chemokines, acute phase proteins, and adhesion molecules[50,51].

The use of omega-3 in an animal model of hepatitis was also able to reduce the production of ROS[52]. In contrast, in patients with advanced NAFLD, the effects of omega-3 supplementation are not evident. However, in the early stages of liver disease, omega-3 supplementation may be effective in counteracting oxidative stress and steatosis[53,54] since there is a correlation between NAFLD and depletion—polyunsaturated fatty acids[55]. In an animal model of alcoholic liver disease, omega-3 supplementation decreased steatosis and alcohol-induced liver injury through multiple mechanisms, including decreased de novo lipogenesis and lipid mobilization from adipose tissue, increased beta-oxidation of mitochondrial fatty acids, reduction of liver inflammation and oxidative stress[56]. The reduction in inflammation results

from the well-described effects of EPA and mainly DHA in competing with AA for the delta-6-desaturase enzyme. This event forms metabolites with anti-inflammatory action, such as resolvins, maresins, and protectins. Decreased lipid accumulation in the liver is mediated through modulation of the activity of nuclear transcription factors such as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c), and sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c). Responsive carbohydrate binding (ChREBP) involves inflammatory pathways and liver lipid metabolism[25,24].

The use of omega-3 in liver disease improves the condition of the liver and thus reduces damage to kidney tissue since the kidney changes observed in HRS are due to complications of cirrhosis. Previous studies have already demonstrated that the use of antioxidants improves and/or protects the liver from the development of cirrhosis and reduces disease complications [57-59].

Cirrhotic animals treated with melatonin showed a reduction in hepatic transaminases in the blood, a decrease in lipoperoxidation, and an increase in SOD activity in the liver, which led to reduced liver damage[58]. Also, in the bile duct ligation cirrhosis model, melatonin treatment improved biochemical and histological parameters and liver inflammatory markers. A significant reduction in lipoperoxidation, SOD activity, and nitric oxide levels was observed[59]. In a model of severe acute hepatitis, the combination of resveratrol + ε-viniferin had a hepatoprotective effect, reducing DNA damage, exhibiting a protective role in the antioxidant pathway by altering the activities of SOD, CAT, and GST, negatively regulating TNFα, COX-2, and iNOS and increasing IL-10[57].

In a chronic kidney injury model with C57BL/6 mice treated with omega-3 for 7 days, lower oxidative stress, inflammation, and fibrosis were demonstrated compared to untreated mice[60]. Moreover, it has already been shown that omega-3 derivatives, maresins, and protectins reduce inflammation and protect the kidneys in acute kidney injury[61]. In a model of acute kidney injury associated with sepsis, pretreatment with maresin-1, a lipid mediator derived from DHA, reduced the production of malondialdehyde and improved the activity of superoxide dismutase in renal tissues while inhibiting the production of reactive oxygen species (ROS) and protected mitochondria[62]. In a clinical trial with hemodialysis patients who received 3g of omega-3 for 2 months, an increase in the antioxidant enzymes SOD and GPx and a reduction in lipoperoxidation were observed, indicating an improvement in the antioxidant status of hemodialysis patients[63]. When added to cell membranes, polyunsaturated fatty acids act as antioxidants and regulate antioxidant signaling pathways. Mitochondrial membranes of eukaryotic cells have a high content of DHA, indicating that DHA is a fundamental phospholipid for synthesizing adenosine triphosphate (ATP) by oxidative phosphorylation. In mitochondria, DHA acts by reducing oxidative stress and the activity of cytochrome-c oxidase (complex IV), as well as increasing the activity of manganese-dependent SOD (Mn-SOD)[47,64]. The protective effect of omega-3 on cardiovascular disease is well known, and dietary supplementation has been shown to reduce mitochondrial dysfunction related to

oxidative stress and endothelial cell apoptosis, an effect that occurs through an increase in the activity of endogenous antioxidant enzymes[47].

Systemic inflammation plays an important role in the pathophysiology of HRS; the exact mechanisms by which systemic inflammation leads to HRS remain to be elucidated[65].

Another important finding in our study was the reduction in nitric oxide metabolites in the kidney tissue of animals treated with omega-3. Nitric oxide (NO) is considered an ambiguous molecule that can act beneficially, such as in providing vasodilation or harmfully, in situations of oxidative stress and deficiency in the antioxidant system[66]. Our research showed a significant increase in NO metabolites in the kidney tissue of cirrhotic animals, and omega-3 attenuated NO production in treated animals, highlighting an antioxidant effect of omega-3 supplementation. This effect was also observed by Bosco *et al*. [67] in the lung tissue of cirrhotic animals in the hepatopulmonary syndrome model when treated with melatonin. It is known that an increase in oxidative stress induces endothelial dysfunction since ROS reduces the bioavailability of NO and increases the synthesis of more toxic oxidative species, such as peroxynitrite[68]. In cirrhosis, the presence of portal hypertension increases the release of NO through increased expression and activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS), and renal vasoconstriction, typical of HRS, also increases the NO content resulting from the activation of iNOS. In this condition, the increase in NO levels is directly related to the oxidative damage to tissues resulting from peroxynitrite formation[69]. Omega-3 supplementation reduces NO levels in kidney tissue and thus reduces the damage caused by nitrosative stress.

On the other hand, omega-3 stimulates the expression and activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), which is one of the important effects of the cardiovascular protective action exerted by omega-3. Furthermore, EPA determines greater NO synthesis by increasing the activation of eNOS induced by AMP-activated protein kinase (AMPK) and the dissociation of eNOS from the inhibitory structure protein caveolin. eNOS activity is also stimulated by DHA, which favors the connection between eNOS and heat shock protein 90 (HSP-90), with activation of the PKB/Akt pathway[70,71]. Treatment with omega-3 was also able to reduce the rate of DNA damage assessed by the comet assay in kidney tissue, inhibit the expression of caspase-9, and increase cell viability in the kidneys of treated cirrhotic animals. DHA pretreatment in LPS-stimulated bone marrow-derived macrophages blocked caspase-1 activation and IL-1b secretion[72]. EPA treatment also reduced oxidative damage and the expression of caspase-9 and caspase-3 in a mouse model of diabetic kidney injury[73]. In a vancomycin renal injury model, the use of DHA was able to inhibit oxidative stress and inactivate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways, which was associated with the upregulation of Bcl-2 and downregulation of caspase-9, caspase-3, cytochrome-c, p38 and JNK[74]. In a model of liver injury caused by valproate, treatment with DHA prevented hepatocellular apoptosis by reducing the expression of cleaved caspase-9 and the number of positive hepatocytes by the TUNEL technique[75]. Caspase-9 acts as an apoptotic trigger stimulated by

factors such as NOX/ROS, ERK1/2, or COX-2, which leads to oxidative and inflammatory damage in liver tissue.

Omega-3, in addition to its important antioxidant effect, is capable of increasing anti-inflammatory prostaglandin E3 and inhibiting IL-1b and TNF-a, in addition to negatively regulating MAPK and ERK and thereby reducing inflammation and apoptosis[75]. Using bioactive metabolites derived from EPA and DHA, such as maresins, resolvins, and protectins, has demonstrated promising results in improving many inflammatory diseases[76]. In a model of acute kidney injury associated with sepsis, pretreatment with maresin-1, a lipid mediator derived from DHA, inhibited the expression of Bax and cleaved caspase-3 while increasing the expression of Bcl-2 in renal tissues.

This effect appears to occur through inhibiting the NOX4/ROS/NF-κB p65 signaling pathway[64]. Maresin-1 also improved inflammation, reduced necrotic areas, and increased cell proliferation, as assessed by the mitotic activity index and Ki-67 expression in the livers of NAFLD animals[77]. Pretreatment with resolvin D1 (RvD1), another lipid mediator derived from DHA, attenuated apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress and also decreased caspase 3 activity in HepG2 cells, an effect mediated through the JNK pathway[78].

In summary, the use of omega-3 treatment for two weeks in cirrhotic animals from the 14th day of BDL showed protective effects on renal tissue, as we demonstrated an antioxidant effect through the reduction in the formation of ROS, decreased lipoperoxidation measured by TBARS, decreased in nitric oxide metabolites. Furthermore, there was an improvement in mitochondrial electrochemical potential and an increase in the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT in the kidneys of treated cirrhotic animals. We also demonstrated the protection of kidney tissue by reducing DNA damage, apoptosis, and cell death in animals with BDL treated with omega-3.

CONCLUSION

The treatment of hepatorenal syndrome remains a challenge. Novel therapies such as serelaxin (recombinant human relaxin-2) that increase renal blood flow, reduce renal vascular resistance, and reverse endothelial dysfunction[79] have not been evaluated in hepatorenal syndrome[7]. The use of Pentoxifylline, a phosphodiesterase inhibitor with anti-TNF-α activity and anti-inflammatory effect, is well-established in patients with AKI-HRS. However, it does not show an added benefit compared with the standard of care alone (midodrine, octreotide, and albumin)[80].

Translational experimental models of hepatorenal syndrome are needed to fill this gap and, hopefully, help identify novel targets for potential drug development. Meanwhile, using substances with protective antioxidant and anti-inflammatory effects can help protect the kidney from the deleterious effects of cirrhosis.

Our results suggest that omega-3 protects kidney tissue by improving oxidative and inflammatory stress parameters and protecting against cellular damage triggered in the kidney by liver cirrhosis. This protective effect may be necessary for maintaining the integrity of renal tissue in patients with advanced liver disease waiting for liver transplantation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul- Brazil (FAPERGS), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial support.

REFERENCES

1 **Garcia-Tsao G**, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. Hepatology. 2010 Apr;51(4):1445-9. doi: 10.1002/hep.23478. PMID: 20077563; PMCID: PMC2882065.

2 **Tsochatzis EA**, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. Lancet. 2014 May 17;383(9930):1749-61. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60121-5. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24480518.

3 **Ojeda-Yuren AS**, Cerda-Reyes E, Herrero-Maceda MR, Castro-Narro G, Piano S. An Integrated Review of the Hepatorenal Syndrome. Ann Hepatol. 2021 May-Jun;22:100236. doi: 10.1016/j.aohep.2020.07.008. Epub 2020 Aug 23. PMID: 32846202.

4 **Ginès P**, Krag A, Abraldes JG, Solà E, Fabrellas N, Kamath PS. Liver cirrhosis. Lancet. 2021 Oct 9;398(10308):1359-1376. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01374-X. Epub 2021 Sep 17. PMID: 34543610.

5 **Russ KB**, Stevens TM, Singal AK. Acute Kidney Injury in Patients with Cirrhosis. J Clin Transl Hepatol. 2015 Sep 28;3(3):195-204. doi: 10.14218/JCTH.2015.00015. Epub 2015 Sep 15. PMID: 26623266; PMCID: PMC4663201.

6 **Ginès P**, Solà E, Angeli P, Wong F, Nadim MK, Kamath PS. Hepatorenal syndrome. Nat Rev Dis Primers. 2018 Sep 13;4(1):23. doi: 10.1038/s41572-018-0022-7. Erratum in: Nat Rev Dis Primers. 2018 Oct 15;4(1):33. PMID: 30213943.

7 **Simonetto DA**, Gines P, Kamath PS. Hepatorenal syndrome: pathophysiology, diagnosis, and management. BMJ. 2020 Sep 14;370:m2687. doi: 10.1136/bmj.m2687. PMID: 32928750.

8 **Silveira KC**, Viau CM, Colares JR, Saffi J, Marroni NP, Porawski M. Cirrhosis induces apoptosis in renal tissue through intracellular oxidative stress. Arq Gastroenterol. 2015 Jan-Mar;52(1):65-71. doi: 10.1590/S0004-28032015000100014. PMID: 26017086.

9 **Colares JR**, Schemitt EG, Hartmann RM, Licks F, Soares MD, Bosco AD, Marroni NP. Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. World J Gastroenterol. 2016 Oct 28;22(40):8918-8928. doi: 10.3748/wjg.v22.i40.8918. PMID: 27833383.

10 **Pereira RM**, dos Santos RA, Oliveira EA, Leite VH, Dias FL, Rezende AS, Costa LP, Barcelos LS, Teixeira MM, Simoes e Silva AC. Development of hepatorenal syndrome in bile duct ligated rats. World J Gastroenterol. 2008 Jul 28;14(28):4505-11. doi: 10.3748/wjg.14.4505. PMID: 18680230; PMCID: PMC2731277.

11 **Tsai YL**, Liu CW, Hsu CF, Huang CC, Lin MW, Huang SF, Li TH, Lee KC, Hsieh YC, Yang YY, Lee TY, Liu HM, Huang YH, Hou MC, Lin HC. Obeticholic acid ameliorates hepatorenal syndrome in ascitic cirrhotic rats by down-regulating the renal 8-iso-PGF2α-activated COX-TXA2 pathway. Clin Sci (Lond). 2020 Aug 14;134(15):2055-2073. doi: 10.1042/CS20200452. PMID: 32725149.

12 **Rodríguez S**, Raurell I, Ezkurdia N, Augustin S, Esteban R, Genescà J, Martell M. The renal effects of droxidopa are maintained in propranolol treated cirrhotic rats. Liver Int. 2015 Feb;35(2):326-34. doi: 10.1111/liv.12472. Epub 2014 Feb 12. PMID: 24517276.

13 **Guo SB**, Duan ZJ, Li Q, Sun XY. Effect of heme oxygenase-1 on renal function in rats with liver cirrhosis. World J Gastroenterol. 2011 Jan 21;17(3):322-8. doi: 10.3748/wjg.v17.i3.322. PMID: 21253390; PMCID: PMC3022291.

14 **Yeboah MM**, Hye Khan MA, Chesnik MA, Skibba M, Kolb LL, Imig JD. Role of the cytochrome P-450/ epoxyeicosatrienoic acids pathway in the pathogenesis of renal dysfunction in cirrhosis. Nephrol Dial Transplant. 2018 Aug 1;33(8):1333-1343. doi: 10.1093/ndt/gfx354. PMID: 29361048; PMCID: PMC6070028.

15 **Chuang CL**, Chang CC, Hsu SJ, Huang HC, Lee FY, Huang LJ, Lee SD. Endotoxemia-enhanced renal vascular reactivity to endothelin-1 in cirrhotic rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2018 Nov 1;315(5):G752-G761. doi: 10.1152/ajpgi.00302.2017. Epub 2018 Aug 10. PMID: 30095297.

16 **Howe PRC**, Evans HM, Kuszewski JC, Wong RHX. Effects of Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Brain Function in Mildly Hypertensive Older Adults. Nutrients. 2018 Oct 2;10(10):1413. doi: 10.3390/nu10101413. Erratum in: Nutrients. 2019 May 10;11(5): PMID: 30279397; PMCID: PMC6213246.

17 **Saini RK**, Keum YS. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review. Life Sci. 2018 Jun 15;203:255-267. doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.049. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29715470.

18 **Wang T**, Zhang X, Zhou N, Shen Y, Li B, Chen BE, Li X. Association Between Omega-3 Fatty Acid Intake and Dyslipidemia: A Continuous Dose-Response Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. J Am Heart Assoc. 2023 Jun 6;12(11):e029512. doi: 10.1161/JAHA.123.029512. Epub 2023 Jun 2. PMID: 37264945; PMCID: PMC10381976.

19 **Vell MS**, Creasy KT, Scorletti E, Seeling KS, Hehl L, Rendel MD, Schneider KM, Schneider CV. Omega-3 intake is associated with liver disease protection. Front Public Health. 2023 Jul 19;11:1192099. doi: 10.3389/fpubh.2023.1192099. PMID: 37538264; PMCID: PMC10394692.

20 **Garcia-Tsao G**, Abraldes JG, Berzigotti A, Bosch J. Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: Risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the study of liver diseases. Hepatology. 2017 Jan;65(1):310-335. doi: 10.1002/hep.28906. Epub 2016 Dec 1. Erratum in: Hepatology. 2017 Jul;66(1):304. PMID: 27786365.

21 **Adebayo D**, Neong SF, Wong F. Refractory Ascites in Liver Cirrhosis. Am J Gastroenterol. 2019 Jan;114(1):40-47. doi: 10.1038/s41395-018-0185-6. PMID: 29973706.

22 **Kulkarni AV**, Anand L, Vyas AK, Premkumar M, Choudhury AK, Trehanpati N, Benjamin J, Kumar G, Joshi YK, Sarin SK. Omega-3 fatty acid lipid emulsions are safe and effective in reducing endotoxemia and sepsis in acute-on-chronic liver failure: An open-label randomized controlled trial. J Gastroenterol Hepatol. 2021 Jul;36(7):1953-1961. doi: 10.1111/jgh.15400. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33450081.

23 **Sumida W**, Uchida H, Tainaka T, Shirota C, Hinoki A, Kato T, Yokota K, Oshima K, Shirotuki R, Chiba K, Tanaka Y. Oral administration of eicosapentaenoic acid suppresses liver fibrosis in postoperative patients with biliary atresia. Pediatr Surg Int. 2018 Oct;34(10):1059-1063. doi: 10.1007/s00383-018-4313-6. Epub 2018 Jul 28. PMID: 30056480.

24 **Scorletti E**, Byrne CD. Omega-3 fatty acids and non-alcoholic fatty liver disease: Evidence of efficacy and mechanism of action. Mol Aspects Med. 2018 Dec;64:135-146. doi: 10.1016/j.mam.2018.03.001. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29544992.

25 **Calder PC**. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. Biochim Biophys Acta. 2015 Apr;1851(4):469-84. doi: 10.1016/j.bbalip.2014.08.010. Epub 2014 Aug 20. PMID: 25149823.

26 **Kountouras J**, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. Br J Exp Pathol. 1984 Jun;65(3):305-11. PMID: 6743531; PMCID: PMC2040968.

27 **Mattiello A**, Filippi A, Pošćić F, Musetti R, Salvatici MC, Giordano C, Vischi M, Bertolini A, Marchiol L. Evidence of Phytotoxicity and Genotoxicity in Hordeum vulgare L. Exposed to CeO2 and TiO2 Nanoparticles. Front Plant Sci. 2015 Nov 25;6:1043. doi: 10.3389/fpls.2015.01043. PMID: 26635858; PMCID: PMC4659259.

28 **Esterbauer H**, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol. 1990;186:407-21. doi: 10.1016/0076-6879(90)86134-h. PMID: 2233308.

29 **Misra HP**, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem. 1972 May 25;247(10):3170-5. PMID: 4623845.

30 **Chance, B**., and Maehly, A.C. (1955) Assay of Catalase and Peroxidase. Methods in Enzymology, 2, 764-775. http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8

31 **Freitas RM**, Vasconcelos SM, Souza FC, Viana GS, Fonteles MM. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. FEBS J. 2005 Mar;272(6):1307-12. doi: 10.1111/j.1742-4658.2004.04537.x. PMID: 15752349.

32 **Singh NP**, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988 Mar;175(1):184-91. doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0. PMID: 3345800.

33 **Nadin SB**, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. J Histochem Cytochem. 2001 Sep;49(9):1183-6. doi: 10.1177/002215540104900912. PMID: 11511687.

34 **Collins AR**, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. Mutat Res. 1995 Jan;336(1):69-77. doi: 10.1016/0921-8777(94)00043-6. PMID: 7528897.

35 **Viau CM**, Moura DJ, Facundo VA, Saffi J. The natural triterpene 3β,6β,16β-trihydroxy-lup-20(29)-ene obtained from the flowers of Combretum leprosum induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. BMC Complement Altern Med. 2014 Aug 2;14:280. doi: 10.1186/1472-6882-14-280. PMID: 25086656; PMCID: PMC4129108.

36 **Emadi Baygi M**, Soheili ZS, Schmitz I, Sameie S, Schulz WA. Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines. Cell Biol Toxicol. 2010 Dec;26(6):553-67. doi: 10.1007/s10565-010-9163-5. Epub 2010 Apr 16. PMID: 20397042.

37 **Lowry OH**, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75. PMID: 14907713.

38 **Gupta K**, Bhurwal A, Law C, Ventre S, Minacapelli CD, Kabaria S, Li Y, Tait C, Catalano C, Rustgi VK. Acute kidney injury and hepatorenal syndrome in cirrhosis. World J Gastroenterol. 2021 Jul 14;27(26):3984-4003. doi: 10.3748/wjg.v27.i26.3984. PMID: 34326609; PMCID: PMC8311533.

39 **Shahidi F**, Ambigaipalan P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. Annu Rev Food Sci Technol. 2018 Mar 25;9:345-381. doi: 10.1146/annurev-food-111317-095850. PMID: 29350557.

40 **Innes JK**, Calder PC. Marine Omega-3 (N-3) Fatty Acids for Cardiovascular Health: An Update for 2020. Int J Mol Sci. 2020 Feb 18;21(4):1362. doi: 10.3390/ijms21041362. PMID: 32085487; PMCID: PMC7072971.

41 **Jiang H**, Wang L, Wang D, Yan N, Li C, Wu M, Wang F, Mi B, Chen F, Jia W, Liu X, Lv J, Liu Y, Lin J, Ma L. Omega-3 polyunsaturated fatty acid biomarkers and risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, cancer, and mortality. Clin Nutr. 2022 Aug;41(8):1798-1807. doi: 10.1016/j.clnu.2022.06.034. Epub 2022 Jun 30. PMID: 35830775.

42 **Gutiérrez S**, Svahn SL, Johansson ME. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. Int J Mol Sci. 2019 Oct 11;20(20):5028. doi: 10.3390/ijms20205028. PMID: 31614433; PMCID: PMC6834330.

43 **Kousparou C**, Fyrilla M, Stephanou A, Patrikios I. DHA/EPA (Omega-3) and LA/GLA (Omega-6) as Bioactive Molecules in Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci. 2023 Jun 27;24(13):10717. doi: 10.3390/ijms241310717. PMID: 37445890; PMCID: PMC10341783.

44 **Assimakopoulos SF**, Vagianos CE. Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? World J Gastroenterol. 2009 Jan 7;15(1):121-3. doi: 10.3748/wjg.15.121. PMID: 19115478; PMCID: PMC2653290.

45 **Miles EA**, Calder PC. Effects of Citrus Fruit Juices and Their Bioactive Components on Inflammation and Immunity: A Narrative Review. Front Immunol. 2021 Jun 24;12:712608. doi: 10.3389/fimmu.2021.712608. PMID: 34249019; PMCID: PMC8264544.

46 **Liu H**, Nguyen HH, Hwang SY, Lee SS. Oxidative Mechanisms and Cardiovascular Abnormalities of Cirrhosis and Portal Hypertension. Int J Mol Sci. 2023 Nov 27;24(23):16805. doi: 10.3390/ijms242316805. PMID: 38069125; PMCID: PMC10706054.)

47 **Oppedisano F**, Macrì R, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Maiuolo J, Bosco F, Nucera S, Caterina Zito M, Guarnieri L, Scarano F, Nicita C, Coppoletta AR, Ruga S, Scicchitano M, Mollace R, Palma E, Mollace V. The Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of n-3 PUFAs: Their Role in Cardiovascular Protection. Biomedicines. 2020 Aug 25;8(9):306. doi: 10.3390/biomedicines8090306. PMID: 32854210; PMCID: PMC7554783.

48 **Djuricic ID**, Mazic SD, Kotur-Stevuljevic JM, Djordjevic VR, Sobajic SS. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid dietary recommendations are moderately efficient in optimizing their status in healthy middle-aged subjects with low fish consumption: a cross-over study. Nutr Res. 2014 Mar;34(3):210-8. doi: 10.1016/j.nutres.2013.12.008. Epub 2014 Jan 3. PMID: 24655487.

49 **Giacobbe J**, Benoiton B, Zunszain P, Pariante CM, Borsini A. The Anti-Inflammatory Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Metabolites in Pre-

Clinical Models of Psychiatric, Neurodegenerative, and Neurological Disorders. Front Psychiatry. 2020 Feb 28;11:122. doi: 10.3389/fpsyt.2020.00122. PMID: 32180741; PMCID: PMC7059745.

50 **Calder PC**. *n*-3 PUFA and inflammation: from membrane to nucleus and from bench to bedside. Proc Nutr Soc. 2020 Jun 22:1-13. doi: 10.1017/S0029665120007077. Epub ahead of print. PMID: 32624016.

51 **Djuricic I**, Calder PC. Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. Nutrients. 2021 Jul 15;13(7):2421. doi: 10.3390/nu13072421. PMID: 34371930; PMCID: PMC8308533.

52 **Li D**, Weisinger HS, Weisinger RS, Mathai M, Armitage JA, Vingrys AJ, Sinclair AJ. Omega 6 to omega 3 fatty acid imbalance early in life leads to persistent reductions in DHA levels in glycerophospholipids in rat hypothalamus even after long-term omega 3 fatty acid repletion. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2006 Jun;74(6):391-9. doi: 10.1016/j.plefa.2006.03.010. Epub 2006 May 23. PMID: 16716580

53 **Yang J**, Fernández-Galilea M, Martínez-Fernández L, González-Muniesa P, Pérez-Chávez A, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Oxidative Stress and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation. Nutrients. 2019 Apr 18;11(4):872. doi: 10.3390/nu11040872. PMID: 31003450; PMCID: PMC6521137.

54 **Spooner MH**, Jump DB. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Omega-3 Fatty Acids: Mechanisms and Clinical Use. Annu Rev Nutr. 2023 Aug 21;43:199-223. doi: 10.1146/annurev-nutr-061021-030223. Epub 2023 May 19. PMID: 37207355.

55 **Videla LA**, Hernandez-Rodas MC, Metherel AH, Valenzuela R. Influence of the nutritional status and oxidative stress in the desaturation and elongation of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: Impact on non-alcoholic fatty liver disease. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2022 Jun;181:102441. doi: 10.1016/j.plefa.2022.102441. Epub 2022 Apr 22. PMID: 35537354.

56 **Wang M**, Ma LJ, Yang Y, Xiao Z, Wan JB. n-3 Polyunsaturated fatty acids for the management of alcoholic liver disease: A critical review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2019;59(sup1):S116-S129. doi: 10.1080/10408398.2018.1544542. Epub 2018 Dec 22. PMID: 30580553.

57 **Fernandes JC**, Schemitt EG, Da Silva J, Marroni NP, Lima A, Ferreira RB. Combination of Trans-Resveratrol and ε-Viniferin Induces a Hepatoprotective Effect in Rats with Severe Acute Liver Failure via Reduction of Oxidative Stress and MMP-9 Expression. Nutrients. 2021 Oct 20;13(11):3677. doi: 10.3390/nu13113677. PMID: 34835933; PMCID: PMC8622851.

58 **Bona S**, Fernandes SA, Moreira ACJ, Rodrigues G, Schemitt EG, Di Naso FC, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin restores zinc levels, activates the Keap1/Nrf2 pathway, and modulates endoplasmic reticular stress and HSP in rats with chronic

hepatotoxicity. World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2022 Mar 5;13(2):11-22. doi: 10.4292/wjgpt.v13.i2.11. PMID: 35433098; PMCID: PMC8968507.

59 **Colares JR**, Hartmann RM, Schemitt EG, Fonseca SRB, Brasil MS, Picada JN, Dias AS, Bueno AF, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin prevents oxidative stress, inflammatory activity, and DNA damage in cirrhotic rats. World J Gastroenterol 2022; 28(3): 348-364 [PMID: 35110954 DOI: 10.3748/wjg.v28.i3.348]

60 **Han S**, Choi H, Park H, Kim JJ, Lee EJ, Ham YR, Na KR, Lee KW, Chang YK, Choi DE. Omega-3 Fatty Acids Attenuate Renal Fibrosis via AMPK-Mediated Autophagy Flux Activation. Biomedicines. 2023 Sep 17;11(9):2553. doi: 10.3390/biomedicines11092553. PMID: 37760994; PMCID: PMC10525956.

61 **Hong S**, Lu Y. Omega-3 fatty acid-derived resolvins and protectins in inflammation resolution and leukocyte functions: targeting novel lipid mediator pathways in mitigation of acute kidney injury. Front Immunol. 2013 Jan 30;4:13. doi: 10.3389/fimmu.2013.00013. PMID: 23386851; PMCID: PMC3558681.

62 **Li J**, Zhang Z, Wang L, Jiang L, Qin Z, Zhao Y, Su B. Maresin 1 Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury via Inhibiting NOX4/ROS/NF-κB Pathway. Front Pharmacol. 2021 Dec 10;12:782660. doi: 10.3389/fphar.2021.782660. PMID: 34955852; PMCID: PMC8703041.

63 **Tayyebi-Khosroshahi H**, Houshyar J, Tabrizi A, Vatankhah AM, Razzagi Zonouz N, Dehghan-Hesari R. Effect of omega-3 fatty acid on oxidative stress in patients on hemodialysis. Iran J Kidney Dis. 2010 Oct;4(4):322-6. PMID: 20852375.

64 **Li R**, Jia Z, Zhu H. Regulation of Nrf2 Signaling. React Oxyg Species (Apex). 2019 Nov;8(24):312-322. PMID: 31692987; PMCID: PMC6830569.

65 **Jung CY**, Chang JW. Hepatorenal syndrome: Current concepts and future perspectives. Clin Mol Hepatol. 2023 Oct;29(4):891-908. doi: 10.3350/cmh.2023.0024. Epub 2023 Apr 13. PMID: 37050843; PMCID: PMC10577351.) Omega-3 supplementation in cirrhotic patients can reduce systemic inflammation and minimize the risk of triggering kidney damage.

66 **Radi R**. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Jun 5;115(23):5839-5848. doi: 10.1073/pnas.1804932115. Epub 2018 May 25. PMID: 29802228; PMCID: PMC6003358.

67 **Bosco AD**, Schedler FB, Colares JR, Schemitt EG, Hartmann RM, Forgiarini Junior LA, et al. Melatonin effects on pulmonary tissue in the experimental model of Hepatopulmonary Syndrome. J bras pneumol [Internet]. 2019;45(3):e20170164. Available from: https://doi.org/10.1590/1806-3713/e20170164

68 **Münzel T**, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. J Am Coll

Cardiol. 2017 Jul 11;70(2):212-229. doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.035. PMID: 28683969; PMCID: PMC5663297.

69 **Anavi S**, Tirosh O. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. Free Radic Biol Med. 2020 Jan;146:16-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.411. Epub 2019 Oct 28. PMID: 31672462.

70 **Zanetti M**, Grillo A, Losurdo P, Panizon E, Mearelli F, Cattin L, Barazzoni R, Carretta R. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Structural and Functional Effects on the Vascular Wall. Biomed Res Int. 2015;2015:791978. doi: 10.1155/2015/791978. Epub 2015 Aug 2. PMID: 26301252; PMCID: PMC4537737.

71 **Lamoke F**, Mazzone V, Persichini T, Maraschi A, Harris MB, Venema RC, Colasanti M, Gliozzi M, Muscoli C, Bartoli M, Mollace V. Amyloid β peptide-induced inhibition of endothelial nitric oxide production involves oxidative stress-mediated constitutive eNOS/HSP90 interaction and disruption of agonist-mediated Akt activation. J Neuroinflammation. 2015 May 3;12:84. doi: 10.1186/s12974-015-0304-x. PMID: 25935150; PMCID: PMC4438457.

72 **Yan Y**, Jiang W, Spinetti T, Tardivel A, Castillo R, Bourquin C, Guarda G, Tian Z, Tschopp J, Zhou R. Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. Immunity. 2013 Jun 27;38(6):1154-63. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.015. PMID: 23809162.

73 **Taneda S**, Honda K, Tomidokoro K, Uto K, Nitta K, Oda H. Eicosapentaenoic acid restores diabetic tubular injury through regulating oxidative stress and mitochondrial apoptosis. Am J Physiol Renal Physiol. 2010 Dec;299(6):F1451-61. doi: 10.1152/ajprenal.00637.2009. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20844021.

74 **Shi H**, Zou J, Zhang T, Che H, Gao X, Wang C, Wang Y, Xue C. Protective Effects of DHA-PC against Vancomycin-Induced Nephrotoxicity through the Inhibition of Oxidative Stress and Apoptosis in BALB/c Mice. J Agric Food Chem. 2018 Jan 17;66(2):475-484. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04565. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29254330.

75 **El-Mowafy AM**, Katary MM, Pye C, Ibrahim AS, Elmarakby AA. Novel molecular triggers underlie valproate-induced liver injury and its alleviation by the omega-3 fatty acid DHA: role of inflammation and apoptosis. Heliyon. 2016 Jul 1;2(7):e00130. doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00130. PMID: 27441301; PMCID: PMC4946287.

76 **Beyer MP**, Videla LA, Farías C, Valenzuela R. Potential Clinical Applications of Pro-Resolving Lipids Mediators from Docosahexaenoic Acid. Nutrients. 2023 Jul 26;15(15):3317. doi: 10.3390/nu15153317. PMID: 37571256; PMCID: PMC10421104.

77 **Rodríguez MJ**, Sabaj M, Tolosa G, Herrera Vielma F, Zúñiga MJ, González DR, Zúñiga-Hernández J. Maresin-1 Prevents Liver Fibrosis by Targeting Nrf2 and NF-κB, Reducing Oxidative Stress and Inflammation. Cells. 2021 Dec 3;10(12):3406. doi: 10.3390/cells10123406. PMID: 34943914; PMCID: PMC8699629.

78 **Jung TW**, Hwang HJ, Hong HC, Choi HY, Yoo HJ, Baik SH, Choi KM. Resolvin D1 reduces ER stress-induced apoptosis and triglyceride accumulation through JNK pathway in HepG2 cells. Mol Cell Endocrinol. 2014 Jun 25;391(1-2):30-40. doi: 10.1016/j.mce.2014.04.012. Epub 2014 Apr 28. PMID: 24784707.

79 **Conrad KP**. Unveiling the vasodilatory actions and mechanisms of relaxin. Hypertension. 2010 Jul;56(1):2-9. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109. 133926. Epub 2010 May 24. PMID: 20497994; PMCID: PMC3392655.

80 **Stine JG**, Wang J, Cornella SL, et al. Treatment of Type-1 Hepatorenal Syndrome with Pentoxifylline: A Randomized Placebo Controlled Clinical Trial. Ann Hepatol 2018;17:300-6. doi:10.5604/01.3001.0010.8661

FOOTNOTES

Institutional review board statement: The study was reviewed and approved by the Federal University of Health Science Institutional Review Board (Approval No. 146/12).

Institutional animal care and use committee statement: All procedures involving animals were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Health Science (CEUA protocol number: 146/12)

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: This research was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Data sharing statement: No additional data are available.

ARRIVE guidelines statement: The authors have read the ARRIVE guidelines, and the manuscript was prepared and revised according to the ARRIVE guidelines.

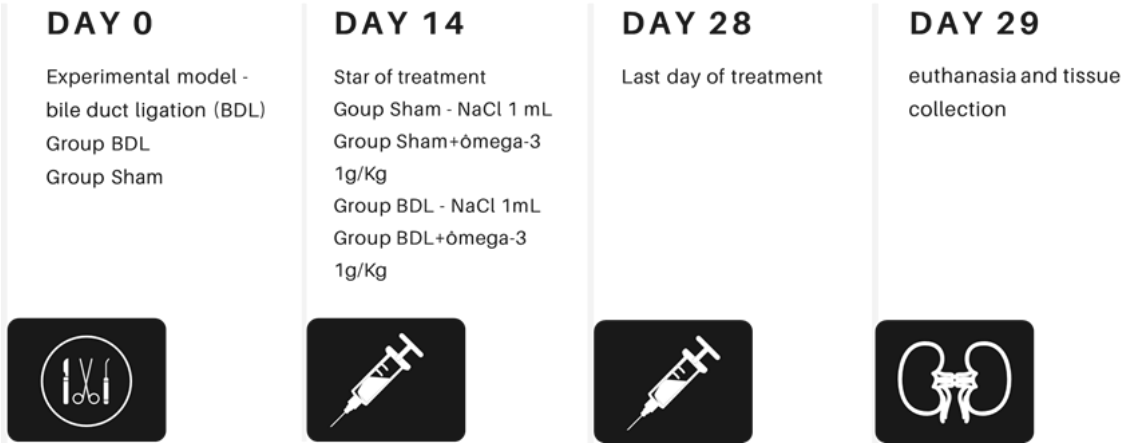

Figure 1 Experimental protocol of omega-3 administration.

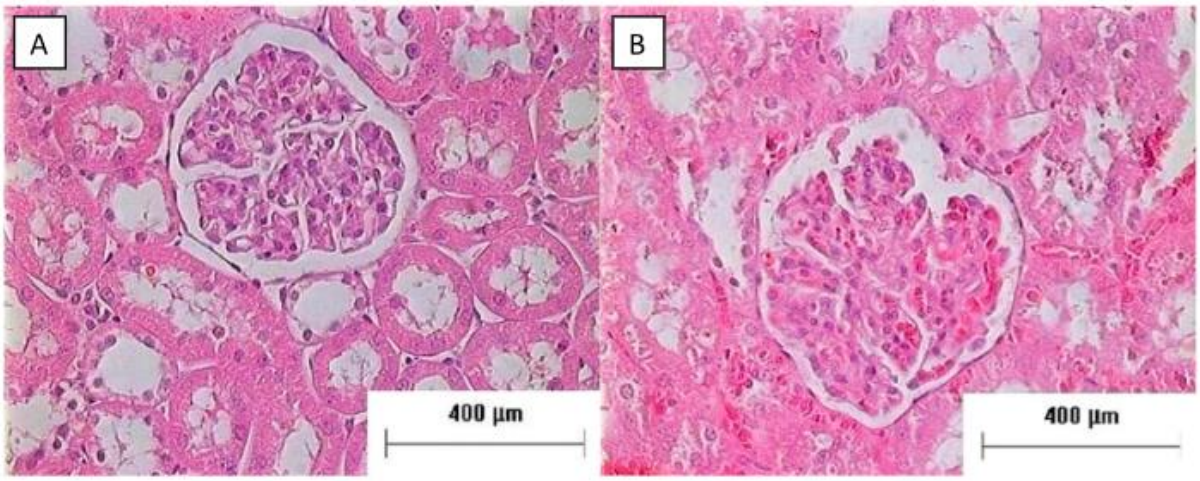

Figure 2 Representative micrographs of the renal slices (hematoxylin and eosin) from bile duct ligated (BDL) and sham-operated (control) rats. A: control group; B: BDL group

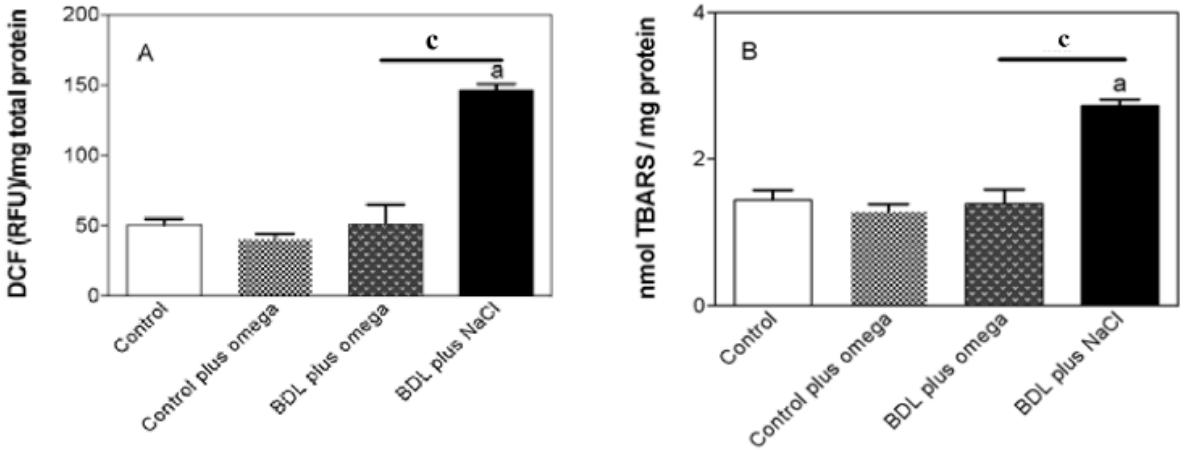

Figure 3 Effect of omega-3 on the generation of free radicals and lipoperoxidation in the kidneys of cirrhotic rats. A- *In vivo* effect of omega-3 on flow cytometry detection of reactive oxygen species in renal homogenates. Mean data for DCF fluorescence. B- Effect of omega-3 on lipoperoxidation measured by TBARS in the kidney of rats. Values represent the mean ± SD of n = 6 animals per group. $_{a}p \leq 0.001$ compared to the control group; $_{b}p \leq 0.001$ compared to the BDL plus NaCl group. DFC (Dichlorofluorescein), TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), BDL (bile duct ligation)

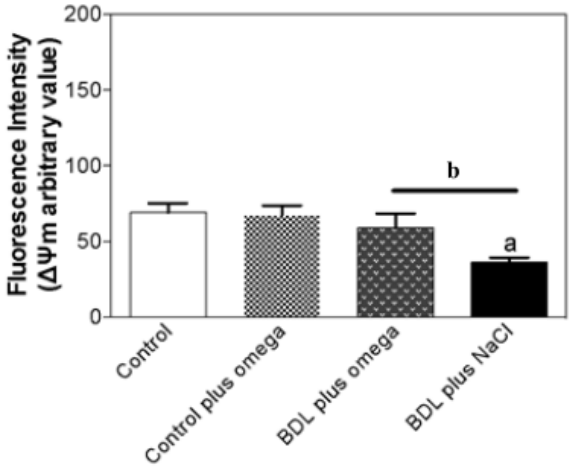

Figure 4 *In vivo* effect of omega-3 on mitochondrial membrane potential in the kidney of rats. Values represent the mean ± SD of n = 6 animals per group. $_{a}p \leq 0.001$ compared to the control group; $_{b}p \leq 0.01$ compared to the BDL plus NaCl group. BDL (bile duct ligation)

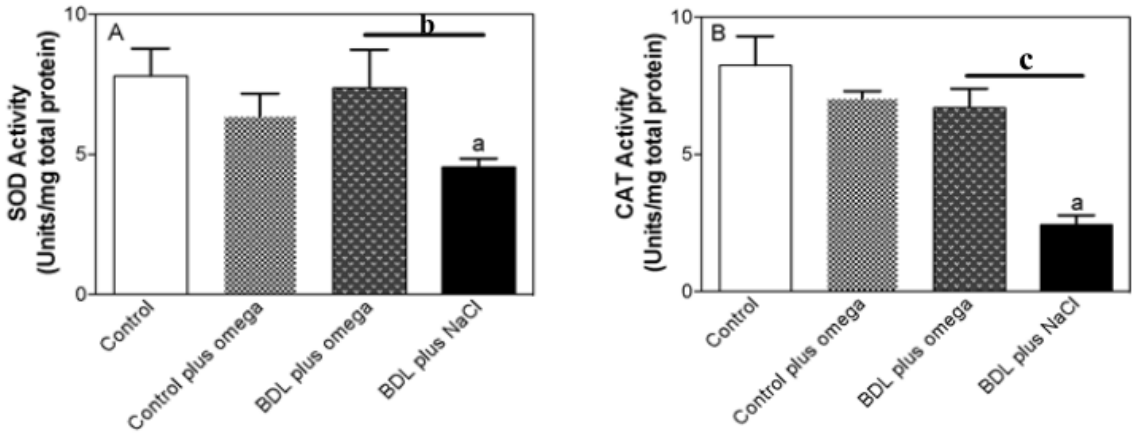

Figure 5 Effect of omega-3 on the activity of antioxidant enzymes measured in the kidneys of cirrhotic rats. A- *In vivo* effect of omega-3 on superoxide dismutase (SOD) activities in the kidneys of rats. B- *In vivo* effect of omega-3 on catalase (CAT) activities in the kidneys of rats. Values represent the mean ± SD of n = 6 animals per group. $_{a}p \leq 0.001$ compared to the control group; $_{b}p \leq 0.01$ and $_{c}p \leq 0.001$ compared to the BDL plus NaCl group. BDL (bile duct ligation)

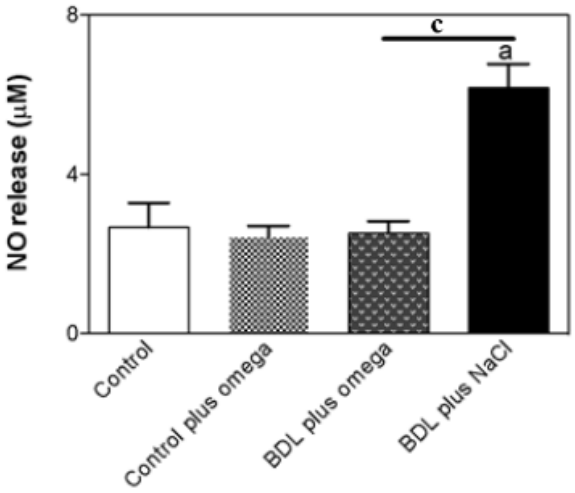

Figure 6 *In vivo* effects of omega-3 on nitric oxide (NO) production. Values represent the mean ± SD of n = 6 animals per group. $_{a}p \leq 0.001$ compared to the control group; $_{b}p \leq 0.001$ compared to the BDL plus NaCl group. BDL (bile duct ligation)

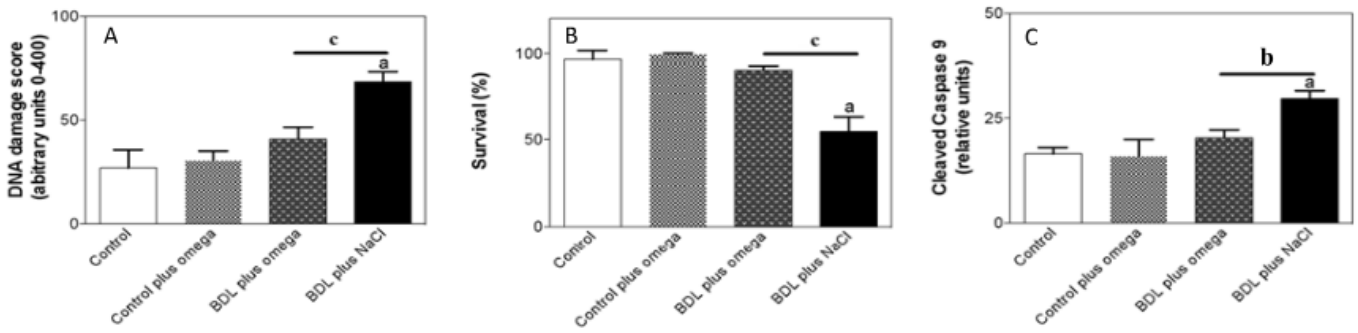

Figure 7 Effect of omega-3 on DNA damage and cell survival in the kidney of cirrhotic rats. A**-** *In vivo* effect of omega-3 on DNA damage in the kidneys of rats. B- Effect of ômega-3 on cell viability determined by trypan blue dye-exclusion assay. C- Effect of ômega-3 on caspase 9 cleaved. Values represent the mean ± SD of n = 6 animals per group. $_{a}p \leq 0.001$ compared to the control group; $_{b}p \leq 0.01$ and $_{c}p \leq 0.001$ compared to the BDL plus NaCl group. BDL (bile duct ligation)