

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENFERMAGEM

**EFEITO DA CURCUMINA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA AGUDIZADA PELA
SÍNDROME ISQUEMIA-REPERFUSÃO**

CAROLINA CONDE

SÃO PAULO

2019

CAROLINA CONDE

**EFEITO DA CURCUMINA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA AGUDIZADA PELA
SÍNDROME ISQUEMIA-REPERFUSÃO**

Monografia apresentada à Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo como trabalho de conclusão se curso do bacharelado em Enfermagem.

Instituição: Escola de Enfermagem da USP

Área: Enfermagem médico-cirúrgica

Aluna: Carolina Conde

Orientadora: Maria de Fátima Fernandes Vattimo

SÃO PAULO

2019

Conde C. Efeito da curcumina na doença renal crônica agudizada pela síndrome isquemia-reperfusão [monografia]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2019.

RESUMO

Introdução: A doença renal crônica (DRC) é fator de risco para lesão renal aguda por isquemia e reperfusão (I/R). A Curcumina, princípio ativo isolado da planta *Curcuma longa* L., possui ação antioxidante e anti-inflamatória que pode agir na prevenção de I/R na DRC. **Objetivo:** Avaliar o efeito da Curcumina na função renal, hemodinâmica e perfil oxidativo renal de ratos com DRC submetidos a I/R. **Materiais e métodos:** Ratos, Wistar, 250-300g, randomizados em quatro grupos: *SHAM* (*controle*, $n=5$): simulação cirúrgica da indução de DRC; *DRC* ($n=5$): ablação de 5/6 dos rins para indução de DRC; *DRC+I/R* ($n=5$): indução de DRC e clampeamento do pedículo renal por 30 minutos; *DRC+I/R+Curcumina* ($n=5$): indução de DRC, administração de Curcumina 30mg/kg/dia, v.o., 10 dias, e clampeamento do pedículo renal por 30 minutos. A função renal foi avaliada pelo *clearance* de inulina, fluxo urinário e creatinina plasmática; a hemodinâmica foi avaliada pela pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), fluxo sanguíneo renal (FSR) e resistência vascular renal (RVR); o perfil oxidativo foi avaliado por peróxidos urinários (método FOX-2), peroxidação lipídica (TBARS), nitrato urinário (NO), reserva antioxidante de glutationa (tióis solúveis não proteicos no tecido renal). **Resultados:** O grupo *DRC+I/R+Curcumina* apresentou elevação do *clearance* de inulina e redução da creatinina plasmática, com diminuição da RVR e aumento do FSR, diminuição de peróxidos urinários, da peroxidação lipídica, do nitrato urinário e aumento dos tióis no tecido renal comparado aos animais do grupo *DRC+I/R*. **Conclusão:** O tratamento com Curcumina preservou a função e hemodinâmica renal dos animais com DRC submetidos ao insulto da I/R promovendo melhora no perfil oxidativo com redução de oxidantes e preservação de reserva antioxidante.

PALAVRAS-CHAVE: Doença renal crônica; Isquemia e reperfusão; Curcumina.

Conde C. Effect of curcumin on chronic kidney disease acute with ischemia-reperfusion syndrome [monograph]. São Paulo: School of Nursing, University of São Paulo; 2019.

SUMMARY

Introduction: Chronic kidney disease (CKD) is a risk factor for acute renal injury due to ischemia and reperfusion (I / R). Curcumin, an active ingredient isolated from the Curcuma longa L. plant, has an antioxidant and anti-inflammatory action that can act to prevent CKD I / R. **Objective:** To evaluate the effect of Curcumin on renal function, hemodynamics and renal oxidative profile of CKD rats submitted to I / R. **Materials and methods:** Rats, Wistar, 250-300g, randomized into four groups: SHAM ($n = 5$): surgical simulation of CKD induction; CKD ($n = 5$): 5/6 kidney ablation for CKD induction; CKD + I / R ($n = 5$): CKD induction and renal pedicle clamping for 30 minutes; CKD + I / R + Curcumin ($n = 5$): CKD induction, administration of Curcumin 30mg / kg / day, v.o., 10 days, and renal pedicle clamping for 30 minutes. Renal function was determined by inulin clearance, urinary flow and plasma creatinine were measured; hemodynamics were assessed by mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), renal blood flow (FSR) and renal vascular resistance (RVR); The oxidative profile was evaluated by urinary peroxides (FOX-2 method), lipid peroxidation (TBARS method), urinary nitrate (Griess method), glutathione antioxidant reserve (non-protein soluble thiols method in renal tissue). **Results:** The CKD + I / R + Curcumin group showed increased inulin clearance and decreased plasma creatinine, with decreased RVR and increased FSR, decreased urinary peroxides, lipid peroxidation, urinary nitrate and increased tissue thiols. compared to animals in the DRC + I / R group. **Conclusion:** Curcumin treatment preserved renal function and hemodynamics of CKD animals submitted to I / R insult, promoting oxidative profile improvement with oxidant reduction and preservation of antioxidant reserve.

KEYWORDS: Chronic kidney disease; Ischemia and reperfusion; Curcumin.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVO	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1 Comitê de ética	8
3.2 Animais	8
3.3 Procedimentos	8
3.4 Grupos experimentais	9
3.5 Coleta da amostra sanguínea e determinação do peso renal	9
3.6 Avaliação da função renal	10
3.7 Avaliação da hemodinâmica renal	11
3.8 Avaliação do perfil oxidativo	11
4 LOCAL	14
5 ANÁLISE DE DADOS	14
6 RESULTADOS	14
6.1 Parâmetros fisiológicos	14
6.2 Função renal	15
6.3 Hemodinâmica global e renal	16
6.4 Perfil oxidativo	17
7 DISCUSSÃO	19
8 CONCLUSÃO	22
9 REFERÊNCIAS	22
ANEXO.....	26

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) consiste na perda gradual, progressiva e irreversível da função renal em nível glomerular, tubular e endócrino, associada ao aumento da albuminúria e redução do ritmo de filtração glomerular^[1]. Estima-se que 10% da população mundial seja afetada pela DRC e que até 2030, aproximadamente 2,2 milhões de pessoas necessitarão de terapia renal substitutiva^[2, 3]. As principais causas do desenvolvimento de DRC são a hipertensão e o diabetes mellitus e o diagnóstico da doença tem implicações severas na vida do indivíduo que geram mudanças nos âmbitos físico, psíquicos e sociais decorrentes da própria síndrome e de seu tratamento^[4, 5].

Na maioria dos indivíduos, a DRC não apresenta sintomas graves até que esteja em estágios avançados. A DRC é clinicamente constatada quando, independentemente da causa, a taxa de filtração glomerular (TFG) está abaixo de 60 mL/min/1,73m² ou quando a TFG está acima de 60 mL/min/1,73m² associada a presença de albuminúria, hematúria glomerular, ou co-morbidade como a doença renal policística do adulto identificada por imagens ultrassonográficas ou alterações histopatológicas confirmadas por biópsias renais^[6].

A DRC é descrita como fator de risco para a ocorrência de lesão renal aguda (LRA) que por sua vez é considerada fator promotor da progressão da DRC^[7].

A isquemia e reperfusão (I/R) é uma das principais causas de LRA^[8]. Na isquemia e reperfusão observam-se mecanismos fisiopatológicos, como a alteração hemodinâmica, disfunção tubular, inflamação, lesão nas células epiteliais e do endotélio que podem evoluir para lesão renal e morte celular. Quando há comprometimento da hemodinâmica, o tecido renal é afetado por redução do fluxo sanguíneo renal (hiporeperfusão) e surgimento de resposta inflamatória. A lesão no endotélio favorece a produção de moléculas de adesão e há aumento na interação endotélio-leucócitos, promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio, realizada pelas células em condição de hipoxia, devido a depleção de ATP. A partir do aumento das espécies reativas de oxigênio, há maior agregação plaquetária, obstrução da microvasculatura renal e aumento da resposta inflamatória^[9].

Apesar da gravidade, a LRA por I/R é considerada reversível e pode ser prevenida. O tratamento convencional é feito por meio de terapia medicamentosa ou intervencionista por revascularização renal [7].

A terapia medicamentosa visa a redução do processo inflamatório e oxidativo decorrente da patogênese da I/R para restaurar a hemodinâmica e função renal. Neste contexto, terapias não farmacológicas com o uso de plantas e fito-suplementos em estudos experimentais já têm demonstrado atividade antioxidante destas intervenções na I/R [9].

A Curcumina, um dos componentes isolados da *Curcuma longa* L., planta pertencente à família Zingiberaceae distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Possui comprovada ação anti inflamatória por conter flavonóides polifenólicos naturais isolados do rizoma e ação antioxidante mesmo em baixas concentrações com impacto e sobre inibição da oxidação da hemoglobina e redução de peroxidação lipídica [10].

O uso da Curcumina no tratamento de indivíduos com DRC agudizada por isquemia e reperfusão destaca-se pela fácil acessibilidade, baixo custo, pequeno risco de efeitos colaterais e melhor adesão por parte dos indivíduos com doença crônica, além disso pode ser indicada por equipe multiprofissional, podendo ser incluída em consulta de enfermagem, na qual o enfermeiro pode adequar a dosagem de acordo com a necessidade individual e avaliação dos resultados [11].

Poucos estudos evidenciam o impacto da Curcumina na função renal e, para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos, e sua aplicação na clínica, os estudos experimentais visam analisar mecanismos fisiopatológicos envolvidos e possibilitar isolar as variáveis biológicas relacionadas ao estudo.

Desta forma, este trabalho se propõe investigar o impacto da intervenção não farmacológica com uso de Curcumina no DRC agudizado pela I/R, com a intenção de contribuir para a proposição de protocolos e guias terapêuticos economicamente acessíveis para a população com DRC que necessitem realizar exame contrastado.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito da Curcumina na função renal, hemodinâmica e perfil oxidativo renal de ratos com DRC submetidos a I/R.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA - FMUSP) sob registro nº 1276/2019 (ANEXO).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos da raça Wistar, machos e adultos, pesando entre 250-300 g. Os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração e permanecerão em condições térmicas com ciclos alternados de dia e noite.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Indução da Doença Renal Crônica

Os animais foram anestesiados com 10mg/kg Xilazina (Anasedan, Vetbrands) e 90mg/kg Ketamina (Dopalen, Ceva), intraperitoneal (i.p.) e submetido à técnica cirúrgica de ablação 5/6 que consiste na realização de laparotomia e realização da nefrectomia à direita e clampeamento cirúrgico de dois ramos da artéria renal esquerda e sutura da incisão abdominal. A indução do DRC foi realizada após adaptação do animal ao meio aquático, no último dia da adaptação [12].

3.3.2 Administração de Curcumina

A Curcumina foi administrada durante 10 dias, a partir do 17º dia do protocolo experimental na dose de 30 mg/kg/dia, via oral (v.o), diluída em solução de carboximetilcelulose 0,5% em volume 0,5ml/100 g [13].

3.3.3 Modelo de injúria renal aguda por isquemia e reperfusão

Os animais foram anestesiados com 10mg/kg Xilazina (Anasedan, Vetbrands) e 90mg/kg Ketamina (Dopalen, Ceva), i.p., e submetidos a laparotomia para clampeamento bilateral dos pedículos renais por 30 minutos com clamps vasculares não traumáticos. Todos os animais foram avaliados na recuperação anestésica e receberam analgésico no pós-operatório (Tramadol: 5 mg/kg, i.p., 8/8h) [14].

3.4 Grupos experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- a) SHAM (n=5):** Ratos submetidos a simulação do ato cirúrgico de indução do modelo de DRC sem alteração das estruturas renais no 1º dia do protocolo experimental;
- b) DRC (n=5):** Ratos submetidos à técnica de ablação de 5/6 dos rins no 1º dia de protocolo experimental
- c) DRC+I/R (n=5):** Ratos submetidos à técnica 5/6 no 1º dia de protocolo experimental e no 26º dia foi feito o clampeamento do pedículo renal por 30 minutos com clamps vasculares não traumáticos.
- d) DRC+I/R+Curcumina (n=5):** Ratos submetidos à técnica 5/6 no 1º dia de protocolo experimental que no 17º dia do protocolo experimental receberam Curcumina 30mg/kg/dia, v.o., até o 27º dia, no 26º dia foi feito o clampeamento do pedículo renal por 30 minutos com clamps vasculares não traumáticos.

3.5 Coleta da amostra sanguínea e determinação do peso renal

Os protocolos experimentais terão duração de 4 semanas (28 dias). No 27º dia do protocolo experimental, os animais dos diversos grupos foram colocados em gaiolas metabólicas para mensuração e coleta do volume urinário de 24 horas. As amostras urinárias foram utilizadas para realização de estudos de função renal e estresse oxidativo.

Retirados das gaiolas metabólicas no 28º dia os animais foram anestesiados

com com 10mg/kg Xilazina (Anasedan, Vetbrands) e 90mg/kg Ketamina (Dopalen, Ceva), i.p., e submetidos aos procedimentos necessários para estudos de função renal pela técnica de determinação do *clearance* de inulina. Em seguida, os animais foram submetidos à laparotomia e coleta de sangue terminal por meio da punção da aorta abdominal. O rim foi retirado, pesado em balança analítica, acondicionado e armazenado em refrigerador a -80°C para estudos posteriores de mensuração de tióis não proteicos.

Ao final do experimento, foi realizada a eutanásia do animal por coleta de sangue terminal, segundo as normas éticas para manuseio de animais em laboratório de pesquisa [15].

3.6 Avaliação da função renal

3.6.1 Clearance de inulina

A taxa de filtração glomerular foi determinada por meio da técnica de *clearance* de inulina. O animal foi anestesiado com 10mg/kg Xilazina (Anasedan, Vetbrands) e 90mg/kg Ketamina (Dopalen, Ceva), i.p., e foi realizada a cateterização da veia jugular para infusão de inulina. Uma dose inicial de 100 mg/kg peso de inulina diluída foi administrada seguida da infusão contínua de 10 mg/kg peso durante 2 horas de experimento, em velocidade de 0,04 ml/min. Após um período de estabilização de 30 minutos, foi iniciada a coleta de urina a cada 30 minutos por meio da cateterização da bexiga e coleta de amostra sanguínea a cada 60 minutos, para análise da concentração de inulina urinária e plasmática pelo método de Antrona [16]. O *clearance* de inulina foi expresso em ml/min/100g [16, 17].

3.6.2 Creatinina sérica e urinária

A dosagem de creatinina urinária e sérica foi determinada pelo método de colorimetria conhecido como método de Jaffé [18]. A quantificação da creatinina sérica será utilizada para avaliação de disfunção renal e a creatinina urinária para normalização em análises do perfil oxidativo.

3.7 Avaliação da hemodinâmica renal

3.7.1 Pressão arterial média e frequência cardíaca

A artéria carótida foi isolada e cateterizada com tubo de polietileno para mensuração da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) registrada por software Registro para Windows 10 [17].

3.7.2 Fluxo sanguíneo renal

A artéria renal esquerda foi isolada e envolvida por sonda ultrassônica para mensuração do fluxo sanguíneo renal (FSR) e registrada por software Registro para Windows 10 [17].

3.7.3 Resistência vascular renal

A resistência vascular renal (RVR) calculada através da fórmula: RVR = PAM /FSR [17].

3.8 Avaliação do perfil oxidativo

3.8.1 Dosagem de peróxidos urinários – Método FOX-2

Os peróxidos são encontrados em todos os fluídios corporais, especialmente na urina. Alterações de seus níveis são consideradas como marcadores de geração de H₂O₂ ou preditores da extensão da lesão oxidativa in vivo. A mensuração direta de peróxidos pode ser realizada por meio do método de análise FOX-2 [19].

O método FOX-2 consiste na determinação dos níveis de peróxido por meio de método ferro-xilenol laranja. Os peróxidos são considerados como potenciais indicadores da formação ou resultantes das moléculas reativas de oxigênio. Os peróxidos oxidam o íon Fe²⁺ para íon Fe³⁺ quando diluídos em solução ácida, como descrita na reação: Fe²⁺⁺ ROOH => Fe³⁺ + RO + OH⁻. O xilenol laranja [ácido (o-cresolsulfonaftalina 3', 3'' -bis (metilamino) ácido diacético] apresenta alta seletividade para o íon Fe³⁺ produzindo um complexo de coloração azul-arroxeadado ($\alpha = 4,3 \times 10^4$ M⁻¹ cm⁻¹). A preparação da solução obedeceu à seguinte ordem para realização do método de xilenol laranja versão 2 (FOX-2): 90 ml de metanol e 10 ml de água

bidestilada; 100 µM de xilenol laranja; 4 mM de BHT (2[6] – di-ter-butil-p-cresol); 25 mM da solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄); 250 µM de sulfato ferroso de amônio (Vetec Química- RJ, Brasil).

A resultante da somatória dos reagentes acima consiste na solução FOX. Na etapa seguinte, 100 µl da amostra urinária foi acrescentada em 900 µl da solução FOX-2. A solução foi homogeneizada e permanecerá em repouso durante 30 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada por espectrofotometria em absorbância de 560nm, após a retirada de resíduos de proteínas ou outros materiais da centrifugação [19]. Os valores foram estabilizados por grama de creatinina urinária e expressos por nmol de peróxidos/grama creatinina urinária.

3.8.2 Dosagem de nitrato urinário – Método de Griess

A síntese de NO foi avaliada por meio da quantificação de nitrato (NO₃-), metabólito estável do NO, pelo método de Griess. A reação é colorimétrica e se baseia na reação dos nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido (pH entre 2,5 e 5,0) formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. Cerca de 150µl da amostra urinária dos diversos grupos foi adicionada a 150µl do reagente que permanecerá em repouso por 15 min. A leitura foi realizada em absorbância de 545 nm em leitor de ELISA. A absorbância das amostras foi comparada a uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) na concentração de 0,1 a 1,0 M [20]. O equacionamento da mensuração de NO foi ajustado para valores de creatinina urinária e todos os valores obtidos foram estabilizados em nmol de NO por grama de creatinina urinária.

3.8.3 Dosagem de peroxidação lipídica – Método de quantificação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) urinário

O MDA é um dos aldeídos frequentemente analisados em métodos analíticos quantitativos e qualitativos para determinação dos índices de peroxidação lipídica e pode ser detectado por vários métodos, dentre eles por meio da reação com o ácido tiobarbitúrico, ao qual reage com várias substâncias, dentre elas o MDA [21].

A dosagem de TBARS na urina consistirá na adição de 0,4 ml da amostra de urina com 0,6 ml de água destilada. Foram acrescentados nessa diluição 1,0 ml de TCA 17,5% e 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico (0,6% pH 2), sendo que todos os tubos de

ensaio com a solução foram mantidos no gelo durante essa primeira etapa do processo. A solução foi homogeneizada e depois colocada em água fervente (banho-maria) durante 20 minutos para reação com ácido tiobarbitúrico. Na etapa seguinte a solução foi retirada do banho-maria, resfriada em gelo e adicionado 1,0 ml de TCA 70%. A solução foi homogeneizada e incubada por 20 minutos em tubo de ensaio tampado. Ao final, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rotações por minuto e a leitura foi realizada por espectrofotometria em absorbância de 534 nm. A quantidade de MDA apresentada em nmol foi calculada usando o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os valores foram expressos por grama de creatinina [21].

3.8.4 Dosagem de reserva antioxidante de glutationa – Método de análise de tióis solúveis não protéicos no tecido renal

O mais relevante composto tiólico presente em sistemas biológicos é a glutationa (GSH). A GSH está presente em todas as células e se constitui em principal tampão redox, onde suas funções biológicas estão centradas no grupamento tiol, presente na cadeia lateral que passa por repetidos ciclos de oxidação e redução. Dessa forma, a GSH se alterna entre sua forma reduzida (GSH - o tiol encontra-se na forma sulfidrila livre) e a sua forma oxidada (GSSG - os tióis de duas moléculas de GSH condensam por uma ligação de dissulfeto). As altas concentrações de GSSG indicam desequilíbrio redox ou presença de lesão oxidativa. Portanto, a mensuração de tióis foi utilizada como indicador de estresse oxidativo, considerando o seguinte princípio: quanto maior o grau de estresse oxidativo, maiores foram os níveis de tióis oxidados e menores concentrações de tióis no tecido renal [22].

A quantificação dos tióis foi realizada a partir de amostras do tecido renal trituradas e homogeneizadas com solução 10 nM de acetato de sódio, 0,5% tween-20 e DTPA (pH 6,5). O homogenato foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C para retirada de debríscas teciduais. Uma alíquota foi reservada para dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford, por meio do uso do kit Bio Rod, e outra alíquota foi utilizada para dosagem dos tióis solúveis [22].

A segunda alíquota foi precipitada com ácido tricloroacético a 10% (1:1) e novamente centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. O volume de 400 µl das amostras precipitadas e diluídas foram homogeneizadas em solução de DTNB e

tampão Tris (pH 8,0). Após 10 minutos de reação, a quantidade de tióis foi determinada pela absorbância das amostras obtidas por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 412 nm. A partir da quantificação de proteínas totais foi feita a correlação com a mensuração de tióis solúveis. Todos os valores obtidos foram estabilizados por nmol de tióis/mg de proteínas totais.

4 LOCAL

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Modelo Animal (LEMA), coordenado pela Prof^a Maria de Fátima Fernandes Vattimo, na Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo (EEUSP).

5 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados parciais foram apresentados como média \pm desvio padrão. Ao término do estudo, os dados finais foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguida de teste comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os valores $p<0,05$ foram considerados significantes.

6 RESULTADOS

Os resultados dos grupos Sham foram considerados padrões de normalidades para animais saudáveis e utilizados para comparação com os demais grupos experimentais DRC considerados doentes.

6.1 Parâmetros fisiológicos

Os animais dos diversos grupos apresentaram pequena variabilidade de peso ao final do protocolo. Os grupos DRC tiveram uma redução no peso corporal final, comparado ao grupo Sham. A indução de I/R nos grupos DRC promoveu uma

redução adicional neste parâmetro. O tratamento com Curcumina demonstrou uma discreta redução nos peso dos animais em relação aos DRC submetidos a I/R.

Os resultados da avaliação do peso do rim demonstram que o grupos DRC e DRC+I/R + Curcumina apresentaram elevação no peso em relação ao grupo Sham. O grupo DRC+I/R teve redução do peso renal comparado aos animais saudáveis e ao grupo DRC, enquanto a administração de Curcumina promoveu elevação neste parâmetro comparado ao grupo DRC + I/R.

A análise da relação Peso rim/Peso animal apresentada na Tabela 1 demonstra que o grupo DRC apresentou elevação significativa nesta razão comparado ao grupo Sham. O grupo DRC+IRA mostrou redução significativa na relação Peso rim/Peso animal comparado ao grupo DRC. O tratamento com Curcumina aumentou numericamente, porém não significativamente, este parâmetro comparado o grupo DRC+I/R+Curcumina com o grupo DRC+I/R.

Tabela 1. Parâmetros corporais dos grupos Sham, DRC, DRC + I/R e DRC+I/R+Curcumina. São Paulo 2019.

Grupos	n	Peso do animal (g)	Peso do rim (gramas)	Peso rim/Peso animal
Sham	5	404 ± 21	1,3 ± 0,2	0,32 ± 0,04
DRC	5	347 ± 34 ^a	1,7 ± 0,2	0,49 ± 0,05 ^a
DRC+I/R	5	333 ± 41 ^a	1,2 ± 0,2 ^b	0,35 ± 0,02 ^b
DRC+I/R+Curcumina	5	329 ± 22 ^a	1,5 ± 0,3	0,46 ± 0,12 ^a

^a p<0,05 versus Sham

^b p<0,05 versus DRC

6.2 Função renal

A Tabela 2 apresenta a avaliação da função renal realizada por meio do clearance inulina, fluxo urinário e mensuração da creatinina sérica.

Na avaliação do fluxo urinário não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. O grupo DRC apresentou valor mais elevado para este parâmetro em relação ao grupo Sham enquanto nos grupos DRC+I/R e DRC+I/R+Curcumina, o fluxo urinário esteve diminuído em comparação ao grupo apenas DRC. O grupo

tratado com Curcumina apresentou fluxo urinário próximo ao valor apresentado pelo grupo DRC+I/R.

A creatinina sérica foi significativamente elevada nos grupos DRC, DRC+I/R e DRC+I/R+Curcumina em relação ao grupo Sham. O grupo DRC+I/R apresentou elevação adicional neste parâmetro comparado ao grupo DRC. O grupo DRC+I/R+Curcumina demonstrou redução na creatinina sérica em comparação ao grupo DRC+I/R.

A função renal, avaliada pelo *clearance* de inulina, apresentou redução significativa em todos grupos DRC comparados ao grupo Sham. Uma significativa redução do *clearance* de inulina foi observada no grupo DRC+I/R em relação ao grupo DRC, enquanto que o DRC+I/R+Curcumina demonstrou elevação neste parâmetro em comparação grupo apenas DRC+I/R.

Tabela 2. Função renal dos grupos Sham, DRC, DRC + I/R e DRC+I/R+Curcumina.
São Paulo 2019.

Grupos	n	Fluxo urinário 24 hrs (ml/min)	Creatinina sérica (mg/dl)	Clearance de inulina (ml/min)
Sham	5	0,013 ±0,003	0,20 ±0,01	0,68 ±0,05
DRC	5	0,015 ±0,006	0,91 ±0,37 ^a	0,28 ±0,06 ^a
DRC+I/R	5	0,011 ±0,002	1,96 ±0,34 ^{ab}	0,09 ±0,04 ^{ab}
DRC+I/R+Curcumina	5	0,010 ±0,003	0,96±0,14 ^{ac}	0,44±0,09 ^{abc}

^a p<0,05 versus Sham

^b p<0,05 versus DRC

^c p<0,05 versus DRC+I/R

6.3 Hemodinâmica global e renal

A avaliação da hemodinâmica renal, apresentada na Tabela 3 foi realizada por meio da verificação de parâmetros hemodinâmicos de frequência cardíaca, pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal.

Os diversos grupos não apresentaram diferença entre os valores de frequência cardíaca e pressão arterial média.

O fluxo sanguíneo renal dos animais DRC, DRC+I/R e DRC+I/R+Curcumina apresentou diminuição significativa comparada ao grupo Sham. O grupo DRC+I/R demonstrou diminuição adicional e significativa no fluxo sanguíneo renal em relação ao grupo apenas DRC, enquanto o grupo DRC+I/R+Curcumina apresentou elevação significativa nesse parâmetro comparado ao grupo DRC+I/R.

A resistência vascular renal de todos os grupos DRC (DRC, DRC+I/R e DRC+I/R+Curcumina) foi significativamente maior em relação ao grupo Sham, sendo que a elevação deste parâmetro foi mais expressiva no grupo DRC+I/R comparado ao grupo DRC. O grupo DRC+I/R+Curcumina apresentou diminuição da resistência vascular renal em relação ao grupo DRC+I/R.

Tabela 3. Hemodinâmica renal dos grupos Sham, DRC, DRC+I/R e DRC+I/R+Curcumina. São Paulo 2019.

Grupos	n	Frequência cardíaca (batimentos por minuto)	Pressão arterial média (mmHg)	Fluxo sanguíneo renal (ml/min)	Resistência vascular renal (mmHg/ml/min)
Sham	5	464,40± 57,43	100,60 ± 11,89	9,28 ± 1,73	11,15 ± 1,62
DRC	5	447,40± 109,15	129,20 ± 23,39	6,13 ± 0,77 ^a	20,30 ± 2,78 ^a
DRC+I/R	5	522,53± 23,29	126,73 ± 22,35	2,21 ±0,34 ^{ab}	57,53 ± 7,79 ^{ab}
DRC+I/R+ Curcumina	5	496,80± 30,21	116,47 ± 13,49	6,03 ± 0,87 ^{ac}	19,69 ± 4,06 ^{ac}

^a p<0,05 versus Sham

^b p<0,05 versus DRC

^c p<0,05 versus DRC+I/R

6.4 Perfil oxidativo

A Tabela 4 apresenta o perfil oxidativo, avaliado por mensuração dos peróxidos urinários, peroxidação lipídica, nitrato urinário e tióis no tecido renal. Os grupos Sham e DRC apresentaram valores com diferenças que não foram considerados significativos entre si.

A excreção de peróxidos urinários nos grupos DRC+I/R e DRC+I/R+Curcumina foram significativamente mais elevados em relação ao grupo Sham. O grupo DRC+I/R apresentou elevação significativa dos peróxidos comparado ao grupo DRC, enquanto

no grupo DRC+I/R+Curcumina foi observado redução significativa da excreção de peróxidos em comparação ao grupo DRC+I/R.,

A peroxidação lipídica foi significativamente mais elevada nos grupos DRC+I/R e DRC+I/R+Curcumina em relação ao grupo Sham. A indução de I/R nos animais DRC determinou aumento adicional significativo neste parâmetro. O grupo DRC+I/R+Curcumina apresentou redução significativa na peroxidação lipídica em comparação ao grupo DRC+I/R.

A excreção do metabólito nitrato urinário do grupo DRC+I/R aumentou significativamente comparado aos grupos Sham e DRC, enquanto no grupo DRC+I/R+Curcumina foi observada redução significativa neste parâmetro em relação ao grupo DRC+I/R.

A mensuração de tióis no tecido renal no grupo DRC+I/R comparado ao grupo Sham estiveram semelhantes, enquanto que o grupo DRC+I/R+Curcumina apresentou elevação significativa nesse parâmetro em relação ao grupo DRC+I/R.

Tabela 4. Perfil oxidativo dos grupos Sham, DRC, DRC + I/R e DRC+I/R+Curcumina.
São Paulo 2019.

Grupos	n	Peróxidos urinários (nmol/g de creatinina urinária)	Peroxidação lipídica (nmol/g de creatinina urinária)	Nitrato urinário (μ M/g de creatinina Urinária)	Tióis no tecido renal (nmol/mg de proteínas totais)
Sham	5	6,61 \pm 2,08	0,009 \pm 0,003	16,00 \pm 5,25	15,74 \pm 6,11
DRC	5	7,60 \pm 1,90	0,010 \pm 0,001	16,40 \pm 5,78	11,10 \pm 1,74
DRC+I/R	5	13,67 \pm 1,48 ^{ab}	0,055 \pm 0,008 ^{ab}	42,24 \pm 7,09 ^{ab}	6,75 \pm 1,45 ^a
DRC+I/R+Curcumina	5	7,90 \pm 1,30 ^{ac}	0,026 \pm 0,004 ^{abc}	22,23 \pm 8,66 ^c	14,51 \pm 1,01 ^c

^a p<0,05 versus Sham

^b p<0,05 versus DRC

^c p<0,05 versus DRC+I/R

7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a reprodução do modelo experimental de DRC agudizado pela I/R submetido ou não ao tratamento com a Curcumina e confirmou o impacto positivo dessa intervenção sobre a função renal, hemodinâmica renal e perfil oxidativo.

A DRC consiste em perda sindrômica progressiva da filtração glomerular, devido a deterioração das funções bioquímicas e fisiológicas [23]. A indução de DRC em animais, realizada por meio da técnica de ablação de 5/6 renal, traduz-se em modelo de ablação de massa renal que reduz drasticamente a taxa de filtração glomerular à semelhança do que ocorre no DRC na clínica [24]. A técnica foi realizada por meio de nefrectomia unilateral à direita e clampeamento cirúrgico de dois ramos da artéria renal esquerda o que resultou em comprometimento funcional renal, aumento do peso do rim e alteração hemodinâmica renal.

O presente estudo, demonstrou-se a elevação da relação peso do rim/peso do animal no modelo crônico de DRC que pode estar associada à hipertrofia compensatória proporcional ao volume renal restante em animais que passaram pela nefrectomia. Decorrente da técnica de ablação de 5/6 com nefrectomia unilateral, ocorre espessamento da membrana glomerular basal e expansão da matriz mesangial caracterizadas por resposta inflamatória e acúmulo de proteínas de matriz extracelular, como fibronectina, colágeno e laminina [25].

A redução abrupta da quantidade de néfrons pela nefrectomia 5/6 promove inicialmente uma lesão renal aguda. Num primeiro momento, em fase compensatória, há o aumento do fluxo urinário como resposta ao mecanismo de hiperfiltração glomerular adaptativa que, se mantida, estimula a produção de renina e resulta em hipertensão glomerular, lesão segmentar com progressiva glomerulosclerose e deterioração da função renal [26, 27].

O comprometimento da função renal evidenciado no presente estudo pela diminuição do clearance de inulina, a hipertrofia renal demonstrada pelo aumento da relação peso do rim/peso animal, a hipertensão glomerular observada com aumento

da resistência vascular renal e a redução de fluxo sanguíneos renais observados nos animais do grupo DRC em relação ao grupo controle saudável Sham comprovaram a efetividade da reprodução do modelo experimental para DRC adotado neste estudo.

A I/R consiste em lesão reversível e subletal nas células, que contribui de maneira significativa para a disfunção tubular renal, com consequente retenção hídrica, o que culmina em uma diminuição ainda mais significativa do fluxo urinário na presença de DRC [28]. O insulto agudo da I/R no DRC, neste estudo, induziu a diminuição da relação peso do rim/peso do animal que pode ser associada a redução funcional renal, pois na condição aguda ocorre redução do ritmo de filtração glomerular com vasoconstrição renal e consequente diminuição do fluxo sanguíneo renal e aumento da resistência vascular renal [29].

Tanto a DRC quanto a I/R levam a redução na taxa de filtração glomerular, alteração que foi evidenciada por alterações na creatinina sérica e *clearance* de inulina. Um importante marcador para diagnóstico clínico da disfunção renal é a creatinina sérica, substância endógena cuja elevação demonstra comprometimento da função renal, enquanto a inulina, substância exógena, é um marcador considerado padrão ouro para determinação experimental da taxa de filtração glomerular, cuja diminuição reflete a redução da função renal em casos de DRC e de forma mais intensa na agudização como no caso de LRA por I/R [30, 17]. No presente estudo os animais DRC apresentaram elevação da creatinina sérica e redução do clearance de inulina. Quando submetidos a indução de I/R observou-se elevação adicional da creatinina sérica acompanhada de redução exacerbada do clearance de inulina, caracterizando condição que confirma que o insulto aguda contribui para a piora e progressão da DRC.

A I/R renal tem como causas mais comuns a redução do fluxo sanguíneo renal, a nefrectomia parcial, o transplante renal, a hipovolemia, a hipotensão, a hipertensão, a angioplastia da artéria renal e a cirurgia de aneurisma da aorta [31]. A I/R ocasiona lesão tecidual durante isquemia que, mesmo após o restabelecimento do fluxo sanguíneo, na reperfusão, exacerba os danos teciduais, devido à produção de EROs [31].

A Curcumina, um pigmento ativo encontrado na Cúrcuma Longa, é

quimicamente considerado um flavonóide e no organismo atua principalmente como um doador de elétrons, o que lhe confere atividade antioxidante [32].

Em modelos *in vivo* e *in vitro* de injúria de I/R miocárdica, a atividade cardioprotetora da Curcumina foi demonstrada com envolvimento da ativação da proteína de sobrevivência celular SIRT1, resultando em preservação da função mitocondrial por manutenção do potencial redox com ativação da enzima antioxidante endógena superóxido dismutase e diminuição de formações de peróxido de hidrogênio [33]. A suplementação com Curcumina em ratos submetidos a I/R coronariana também resultou em melhora do desempenho funcional, efeito antiapoptótico, além da melhora funcional e atividade antioxidante [34].

Estudo em modelo de I/R por oclusão uni ou bilateral do pedículo renal de ratos já demonstrou eficácia do tratamento com Curcumina, com melhora da função renal, associada à diminuição de marcadores inflamatórios, redução de proteínas da matriz, além de eliminação de EROs diretamente e indução indireta de enzimas antioxidantes [35].

Corroborando os achados dos estudos citados que mostram o papel benéfico que a Curcumina em modelos agudos de lesão por I/R renal e cardíaca, o presente estudo reafirma os efeitos benéficos do pré-tratamento com Curcumina na I/R renal e destaca o seu papel terapêutico em presença de DRC.

Neste estudo, observou-se efeito benéfico da Curcumina no DRC+I/R em animais com melhora da função renal, demonstrada por elevação do clearance inulina, além de melhora hemodinâmica renal, demonstrada por elevação do fluxo sanguíneo renal e redução do fluxo sanguíneo renal, somado a melhora do balanço redox por redução dos metabólitos oxidativo (peróxidos urinários, TBARS e nitrato urinário) acompanhado de manutenção da reserva antioxidante tiólica no tecido renal.

Considerando que a sobreposição de I/R à DRC representa fator de indução à progressão da condição crônica e que medidas com baixo risco terapêutico e excelentes respostas funcionais de renoproteção como a demonstrada nesse estudo pela Curcumina, o estudo reitera a importância do incentivo ao desenvolvimento de estudos que confirmem em definitivo o efeito renoprotetor desse fitomedicamento e sua introdução em guias terapêuticos.

8 CONCLUSÃO

O modelo de ablação de massa renal 5/6 induziu a redução da função renal, hipertrofia renal, aumento da resistência vascular renal e redução do fluxo sanguíneo renal.

A I/R desencadeou um decréscimo da função renal e maior comprometimento da hemodinâmica renal com lesão oxidativa evidenciada pela elevação dos peróxidos urinários, TBARS, NO e por uma diminuição da reserva antioxidante tiólica.

O tratamento com Curcumina preservou a função e hemodinâmica renal dos animais com DRC submetidos ao insulto da I/R, promovendo melhora no perfil oxidativo com redução de oxidantes e preservação de reserva antioxidante.

9 REFERÊNCIAS

1. Mahmoodi BK, Matsushita K, Woodward M, Blankestijn PJ, Cirillo M, Ohkubo T, Rossing P, et al. Associations of kidney disease measures with mortality and end- stage renal disease in individuals with and without hypertension: a meta-analysis. Lancet, vol. 380, no. 9854, pp.:1649-61, 2012.
2. International Society of Nephrology. Chronic Kidney Disease. Disponível em <<https://www.theisn.org/focus/ckd>> Acessado em 12 de Dezembro de 2018.
3. Mezzano AS, Aros E C. Doença renal crônica: Classificação, mecanismos de progressão e estratégias de renoproteção. Rev Med Chil, vol. 133, no. 3, pp.: 338-48, 2005.
4. Romão Junior JE. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. Bras Nefrol, vol. 26, no. 3, Supl 1, pp.: 1-3, 2004.
5. Ramírez PCA, Solano RMC. Social construction of the experience of living with chronic kidney disease. Rev. Latino-Am, vol. 26, pp.: e3028. 2018.

6. Bastos MG, Kirsztajn GMi. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. *J. Bras. Nefrol*, vol. 33, no. 1, pp.: 93-108, 2011.
7. Salame M et al. Nefropatia isquêmica. *J Vasc Bras*, vol. 11, no. 4, pp.: 310-316. 2012.
8. Dezoti C, Watanabe M, Pinto CF, Neiva LBM, Vattimo MFF. Proteção funcional da enzima heme-oxigenase-1 na lesão renal aguda isquêmica e tóxica. *Acta paul. Enferm*, vol. 22, pp.: 490-493. 2009.
9. Cordeiro, PM. Efeito da Justicia acuminatissima na injúria renal aguda isquêmica: estudo experimental. [Tese] Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo. São Paulo: 2016.
10. Hernández M, Wicz S, Santamaría MI H, Corral RS. Curcumin exerts anti-inflammatory and vasoprotective effects through amelioration of NFAT-dependent endothelin-1 production in mice with acute Chagas cardiomyopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 113, no. 9, pp.: e180171, 2018.
11. Aguiar WH. Enfermagem: teoria, conceitos, princípios e processos. *Rev Esc Enferm USP*, vol. 8, no. 1, pp.: 7-17, 1974.
12. Liu T, Luo W, Tan X, Fang Y, Chen J, Zhang H, et al. A novel contrast-induced acute kidney injury model based on the 5/6-nephrectomy rat and nephrotoxicological evaluation of Iohexol and Iodixanol *in vivo*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, no. 2014; pp.: 427560, 2014.
13. Sharma S, Kulkarni SK, Chopra K. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 33, no. 10, pp.: 940-5, 2006.
14. Watanabe M, Moura NLB, Costa SCX, Martins LFR, Vattimo MFF. Isoflavone and the heme oxygenase system in ischemic acute kidney injury in rats. *Food Chem Toxicol*, vol. 45, no. 12, pp.: 2366-71, 2007.
15. Brasil. Resolução normativa nº 13 de 20 setembro de 2013. Institui a diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Diário Oficial da União, Brasília, 26 set 2013. Seção 1.
16. Whiter P, Samson FE. "Determination of inulin in plasm and urine by use of antrone". *J Lab Clin Med*, vol. 43, no., pp.: 45-48, 1954.

17. Luchi WM, Shimizu MH, Canale D, Gois PH, de Bragança AC, Volpini RA, Girardi AC, Seguro AC. Vitamin D deficiency is a potential risk factor for contrast-induced nephropathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 309, no.3, pp.: R215-22, 2015.
18. Owen JA, Iggo B, Scandrett FJ, Stewar CP t. The determination of creatinine in plasma or serum, and in urine; a critical examination. *Biochem J*, vol. 58, no. 3,pp.: 426–437, 1954.
19. Banerjee D, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob J. Urinary Hydrogen peroxide: a probably marker of oxidative stress in malignancy. *Clin Chim Acta*, vol. 334, no. 1-2, pp.: 205-9, 2003.
20. Green LC, Wagner DA, Glogwski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, vol. 126, no. 1, pp.: 131-8, 1982.
21. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci*, vol. 37, no. 3, pp.: 293-303, 2001.
22. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Cell signally and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol*, vol. 64, no. 5-6, pp.: 1057-64, 2002.
23. Ribeiro RCHM, Oliveira GASA, Ribeiro DF, Bertolin DC, Cesarino CB, Lima LCE et al. Caracterização e etiologia da insuficiência renal crônica em unidade de nefrologia do interior do Estado de São Paulo. *Acta paul. Enferm*, vol. 21, pp.: 207-211, 2008.
24. Chauntin A, Ferris EB: Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy. *Arch Intern Med*, vol. 49, pp.:767-787, 1932.
25. Fernandes SM, Martins DM, da Fonseca CD, Watanabe M, Vattimo Mde F. Impact of Iodinated Contrast on Renal Function and Hemodynamics in Rats with Chronic Hyperglycemia and Chronic Kidney Disease. *Biomed Res Int*, vol. 2016, pp.:3019410, 2016.
26. Martins, Daniel Malisani. Resveratrol atenua a nefotoxicidade do contraste na doença renal crônica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Escola de Enfermagem; 2016. Doi:10.11606/D.7.2017.tde-19062017-180846.
27. Kujal P, Vernerová Z. 5/6 nephrectomy as an experimental model of chronic renal failure and adaptation to reduced nephron number. *Cesk Fysiol*, vol. 57, no. 4, pp.:104-9, 2008.

28. Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 278, pp.: F1-F12, 2000.
29. Barros LNM, Vattimo MFF. A pesquisa básica aplicada à clínica na lesão renal aguda. *Enferm. Glob.*, vol. 11, no.26, pp.: 290-299, 2012.
30. Magro MCS, Vattimo MFF. Avaliação da função renal: creatinina e outros biomarcadores. *Rev. bras. ter. intensiva* . 2007; 19 (2): 182-185.
31. Borges JCA, Saturnino KC, Cruz VS, Araújo EG. Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer, vol. 16, no. 29, pp.: 48-62, 2019.
32. Anjomshoa S, Namazian M, Noorbala MR. The Effect of Solvent on Tautomerism, Acidity and Radical Stability of Curcumin and Its Derivatives Based on Thermodynamic Quantities. *Journal of Solution Chemistry*, vol. 45, pp.: 1021-1030, 2016.
33. Yang Y, Duan W, Lin Y, Yi W, Liang Z, Yan J, Wang N, Deng C, Zhang S, Li Y, Chen W, Yu S, Yi D, Jin Z. SIRT1 activation by curcumin pretreatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*, vol. 65, pp.:667-679. 2013.
34. Liu H, Wang C, Qiao Z, Xu Y. Protective effect of curcumin against myocardium injury in ischemia reperfusion rats. *Pharm Biol*, vol. 55, no. 1, pp.:1144-1148, 2017.
35. Jacob A, Chaves L, Eadon MT, Chang A, Quigg RJ, Alexander JJ. Curcumin alleviates immune-complex-mediated glomerulonephritis in factor-H-deficient mice. *Immunology*, vol. 139, no. 3, pp.:328-37, 2013.

ANEXO



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito da Curcumina na lesão renal aguda por isquemia/reperfusão em ratos com doença renal crônica**" registrada com o nº **1276/2019**, sob a responsabilidade de **Maria de Fátima Fernandes Vattimo e Carolina Conde**, apresentada pela Escola de Enfermagem USP - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Faculdade de Medicina da USP em **02.04.2019**

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Ínicio: 18-03-2019 Término: 18-03-2020
Espécie/linhagem/raça	Rato wistar
Nº de animais	28
Peso/Idade	8 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério do ICB

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 02 de Abril de 2019

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais