

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENFERMAGEM

DOUGLAS IKEDO MACHADO

**O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA CURCUMINA NA LESÃO
POR ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL EM RATOS DIABÉTICOS**

São Paulo

2019

DOUGLAS IKEDO MACHADO

**O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA CURCUMINA NA LESÃO POR
ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL EM RATOS DIABÉTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola
de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Instituição: Escola de Enfermagem da USP

Área: Enfermagem médico-cirúrgica

Aluno: Douglas Ikedo Machado

Orientadora: Maria de Fátima Fernandes Vattimo

São Paulo

2019

Machado DI. O efeito anti-inflamatório da Curcumina na lesão por isquemia/reperfusão renal em ratos diabéticos [monografia]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2019.

RESUMO

Introdução: A presença do Diabetes Mellitus (DM) aumenta a suscetibilidade para injúria renal aguda causada por isquemia e reperfusão (I/R) que, na clínica, podem coexistir em pacientes diabéticos em condições críticas. I/R e DM compartilham mecanismos fisiopatológicos comuns como a inflamação e a oxidação. A Curcumina, presente na *Cúrcuma longa* L., é considerada um fitomedicamento com propriedades anti-inflamatórias.

Objetivo: Avaliar o efeito do tratamento prévio com Curcumina na função renal, hemodinâmica e perfil oxidativo de ratos diabéticos submetidos a I/R. **Metodologia:** Foram utilizados ratos da raça Wistar, machos e adultos, pesando entre 250-290 g, randomizados em quatro grupos: Citrato: receberam o tampão citrato em pH 4,2, i.v., caudal, dose única, no 1º dia do protocolo; DM: receberam 65 mg/kg de STZ, i.v., caudal, dose única, diluída em tampão citrato, pH 4,2 no 1º dia de protocolo; DM + I/R: receberam 65 mg/kg de STZ, i.v., caudal, dose única, diluída em tampão citrato, pH 4,2 no 1º dia de protocolo, no 26º dia foi feito o clampeamento bilateral dos pedículos renais por 30 minutos com clamps vasculares não traumáticos; DM + I/R + Curcumina: animais diabéticos que no 17º dia do protocolo receberam Curcumina 30mg/kg/dia, v.o., até o 27º dia, no 26º dia foi feito o clampeamento bilateral dos pedículos renais por 30 minutos com clamps vasculares não traumáticos. A função renal foi avaliada por meio do *clearance* de inulina, proteinúria, fluxo urinário, creatinina plasmática e urinária. A hemodinâmica renal foi avaliada pela mensuração do fluxo sanguíneo renal (FSR) e cálculo da resistência vascular renal (RVR). O perfil oxidativo foi analisado pela mensuração dos peróxidos urinários (PU), nitrato urinário (NO), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e tióis no tecido renal. **Resultados:** O tratamento com Curcumina nos animais diabéticos submetidos ao insulto de I/R resultou em aumento do *clearance* de inulina e redução da creatinina sérica, além de a hemodinâmica renal mostrar elevação do FSR e redução da RVR, com melhora do perfil oxidativo com redução dos metabólitos oxidativos e nitrosativos (PU, TBARS, NO) e aumento de reserva antioxidante tiólica. **Conclusão:** A Curcumina promoveu melhora da função renal de ratos diabéticos submetidos a I/R com proteção na hemodinâmica renal e perfil oxidativo renal quando comparados com aqueles que não receberam o fitomedicamento.

Palavras chaves: Diabetes; Cúrcuma; Isquemia/reperfusão

Machado DI. The anti-inflammatory effect of Curcumin on renal ischemia / reperfusion injury in diabetic rats [monograph]. São Paulo: School of Nursing, University of São Paulo; 2019.

SUMMARY

Introduction: The presence of Diabetes Mellitus (DM) increases the susceptibility to acute kidney injury caused by ischemia and reperfusion (I/R) which, in the clinic, may coexist in diabetic patients in critical conditions. I/R and DM share common physiopathological mechanisms, like inflammation and oxidation. Curcumin, present in *Curcuma longa* L., is a phytomedicine with a natural anti-inflammatory effect. **Objective:** The aim of this study is to evaluate the effect of previous Curcumin treatment on renal function, hemodynamics and oxidative profile of diabetic rats submitted to I/R. **Methods:** Wistar male adult rats, weighing 250-290 g were randomized into four groups: Citrate: received citrate buffer at pH 4.2, i.v., single dose, on day 1 of protocol; DM: received 65 mg / kg STZ, i.v., tail, single dose, diluted in citrate buffer, pH 4.2 on day 1 of protocol; DM + I / R: received 65 mg / kg STZ, iv, tail, single dose, diluted in citrate buffer, pH 4.2 on day 1 of protocol, on day 26 bilateral renal pedicle clamping for 30 minutes, with non-traumatic vascular clamps; DM + I / R + Curcumin: Diabetic animals that on day 17 of the protocol received Curcumin 30mg / kg / day, until the 27th day, on the 26th day bilateral renal clamping of the pedicles for 30 minutes with non-traumatic vascular clamps. Renal function was assessed by inulin clearance, proteinuria, urinary flow, plasma and urinary creatinine. Renal hemodynamics were assessed by measuring renal blood flow (RBF) and calculating renal vascular resistance (RVR) and oxidative profile by measuring urinary peroxides (UP), urinary nitrate (NO), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and thiols in renal tissue. **Results:** Curcumin treatment in diabetic animals submitted to I / R insult resulted in increased inulin clearance and decreased serum creatinine. Renal hemodynamics showed increased RBF and decreased RVR, accompanied by an improvement in oxidative profile with a reduction in oxidative and nitrosative metabolites (UP, TBARS, urinary nitrate) and an increase in thiol antioxidant reserve. **Conclusion:** Curcumin promoted renal function improvement in diabetic rats submitted to I / R with beneficial repercussion on renal hemodynamics and renal oxidative profile comparing with control rats.

Keywords: Diabetes; Turmeric; Ischemia / reperfusion

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica complexa cada vez mais comum ao redor do mundo, e de acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018, sua manifestação clínica, juntamente com suas condições associadas, são decorrentes de diversos fatores tais como genéticos, ambientais, sociais e imunológicos. Conforme dados apresentados pela Federação Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, IDF, 2015), o DM afeta 8,8% da população mundial o que significa que 415 milhões de pessoas convivem com DM no mundo ^[1,2].

A hiperglicemia é apontada como causadora das complicações decorrentes do DM, sendo essas classificadas como microvasculares (nefropatia, retinopatia e neuropatia) ou macrovasculares (acidente vascular encefálico e aterosclerose) ^[3]. Uma das principais complicações do DM em indivíduos com hiperglicemia sustentada é doença renal do diabetes (DRD), ou também conhecida como nefropatia diabética (ND), presente em cerca de 30% a 50% dos pacientes ^[1]. Clinicamente, a classificação da ND é caracterizada por redução da taxa de filtração glomerular (TFG) e proteinúria (excreção urinária de albumina - EUA), que na maioria das vezes, está associada a uma elevação da pressão arterial ^[1].

A hiperglicemia sustentada induz o metabolismo da glicose excedente promovendo a formação de produtos de glicação avançada (AGEs) com produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) principalmente através da via das hexosaminas e via dos polióis, alterando mediadores de vasoconstrição (prostaglandina) e vasodilatação (óxido nítrico) que resultam em insulto hemodinâmico com redução do fluxo sanguíneo renal ^[3]. A manutenção dessas lesões favorece a produção endógena de citocinas pró-inflamatórias que dão início ao processo inflamatório associado aos processos redox, que perpetua a produção de EROs ^[3]. A simultaneidade desses eventos resulta em glomeruloesclerose e lesão túbulo-intersticial aumentando a suscetibilidade de indivíduos diabéticos para lesão renal aguda causada por isquemia e reperfusão (I/R) ^[3,4].

A I/R é a principal causa de injúria renal aguda (IRA) decorrente de procedimentos como transplante renal, cirurgia vascular da aorta e das artérias renais e nefrectomia parcial resultando em redução da função renal. Isso porque, durante a hipovolemia, ocorrem alterações vasculares com intenção de manter TFG. Dependendo da duração desse insulto,

a reperfusão causará lesões tubulares e vasculares, em parte devido a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e EROs durante a isquemia. Essa condição inflamatória com oxidação causa também desequilíbrio da integridade da parede endotelial que aumenta a sua permeabilidade levando a infiltração de leucócitos ao parênquima renal [5,6].

Para conter o aparecimento das complicações da I/R agravadas no DM preconiza-se o pré-tratamento utilizando medicamentos alopáticos e fitoterápicos. A *Cúrcuma longa linn*, popularmente conhecido como Cúrcuma, Açafrão da Terra, Gengibre Amarelo e Raiz de Sol, é um fitomedicamento com propriedades farmacológicas provenientes do princípio ativo presente na planta chamado Curcumina, o qual têm sido analisado em vários estudos experimentais comprovando sua eficácia em um amplo espectro de vias e alvos moleculares, com capacidade de atuar na diminuição dos níveis sanguíneos de glicose, modulação de fatores de transcrição, ações analgésicas e efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios [7].

A atividade anti-inflamatória da Curcumina é atribuída a sua capacidade de modular a sinalização do fator de transcrição NF-kB, de ação inflamatória, dependente da citocina pró- inflamatória TNF- α . Há também evidências em células hepáticas de ratos, que a Curcumina ativa fatores peroxissoma γ (PPAR γ), os quais inibem a ativação de NF kB [8,9].

Adicionalmente, em modelo de I/R cerebral, a Curcumina demonstrou efeitos antioxidantes, inibindo EROs, NADPH oxidase (fonte de radicais livres de oxigênio) e eliminando radicais hidroxila, superóxidos e oxigênio singleto [9].

Como visto a I/R e DM são complicações prevalentes no cotidiano clínico e compartilham mecanismos fisiopatológicos comuns. O uso de fitomedicamentos como *Justicia acuminatissima*, *Uncaria tomentosa* e *Isoflavona* têm se demonstrado eficaz na redução dos efeitos de comprometimento da função renal na I/R em modelos experimentais [10,11,12]. A hipótese desse estudo é que a Curcumina possa exercer efeito renoprotetor na situação de insulto agudo por isquemia na coexistência com DM.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito da Curcumina na função renal, hemodinâmica e perfil oxidativo de

ratos diabéticos submetidos a I/R.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA - FMUSP) sob protocolo nº 1275/2019.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos da raça Wistar, machos e adultos, pesando entre 250- 290 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 DM

O DM foi induzido por meio da administração de 65 mg/kg intravenosa (i.v.) caudal de Estreptozotocina (STZ) (Sigma Chemical Company, St Luis, MO, EUA) dissolvida em tampão citrato, pH 4,2. Foram considerados diabéticos os animais que apresentarem glicemia acima de 250 mg/dl, 48 horas após o procedimento de indução. A determinação quantitativa da glicemia foi feita em amostra de sangue capilar fresco coletado a partir de punção caudal e os valores foram obtidos por meio de tiras-teste e monitor de glicemia (Accu Chek® Active, Roche Diagnostics) ^[3]. Durante quatro semanas subsequentes, o peso corporal e a glicemia foram controladas semanalmente.

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/100g ^[9].

3.3.3 Modelo de injúria renal aguda por isquemia e reperfusão

Os animais foram anestesiados com Thiopentax® (tiopental sódico: 50 mg/kg, 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) [6].

3.4 Grupos experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- a) Citrato (n=5):** animais que receberam o tampão citrato (dilúente da STZ) em pH 4,2, i.v., caudal, dose única, no 1º dia do protocolo experimental;
- b) DM (n=5):** animais que receberam 65 mg/kg de STZ, i.v., caudal, dose única, diluída em 0,1M de tampão citrato em pH 4,2 no 1º dia de protocolo experimental
- c) DM + I/R (n=5):** animais que receberam 65 mg/kg de STZ, i.v., caudal, dose única, diluída em 0,1M de tampão citrato em pH 4,2 no 1º dia de protocolo experimental, no 26º dia foi feito o clampeamento bilateral dos pedículos renais por 30 minutos com clamps vasculares não traumáticos.
- d) DM + I/R + Curcumina (n=5):** animais diabetizados 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 bilateral dos pedículos renais por 30 minutos com clamps vasculares não traumáticos.

3.5 Parâmetros avaliados

3.5.1 Ingesta alimentar e a mensuração do peso corporal

O consumo alimentar e o peso corporal dos animais foram verificados semanalmente por meio de balança analítica e os resultados foram expressos em gramas.

3.5.2 Glicemia

A determinação quantitativa da glicemia foi feita em amostra de sangue capilar fresco coletado a partir de punção caudal e os valores foram obtidos por meio de tiras-teste e monitor de glicemia (Accu Chek® Active, Roche Diagnostics).

3.6 Coleta da amostra sanguínea e determinação do peso renal

Os protocolos experimentais terão duração de 4 semanas (28 dias) durante as quais o peso corporal e a glicemia dos animais foram controladas semanalmente. No 27º dia do protocolo experimental, os animais dos diversos grupos foram colocados em gaiolas metabólicas para mensuração do volume urinário, ingesta hídrica e alimentar 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 Thiopentax® (tiopental sódico: 50 mg/kg) 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 direito foi retirado e em seguida pesado para o cálculo da razão peso do rim/peso do animal e o rim esquerdo foi removido, 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 [13].

3.7 Avaliação da função renal

3.7.1 Clearance de inulina

A taxa de filtração glomerular foi determinada por meio da técnica de *clearance* de inulina. O animal foi anestesiado com Thiopentax® (tiopental sódico: 50 mg/kg) 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. O *clearance* de inulina foi expresso em ml/min/100g ^[14, 15].

3.7.2 Creatinina sérica e urinária

A dosagem de creatinina urinária e sérica foi determinada pelo método de colorimetria conhecido como método de Jaffé ^[16].

3.8 Avaliação da hemodinâmica renal

A artéria renal esquerda foi isolada e envolvida por sonda ultrassônica para mensuração do fluxo sanguíneo renal (FSR). A pressão arterial média (PAM) foi registrada por meio da cateterização da artéria carótida para avaliação da resistência vascular renal (RVR) calculada através da fórmula: $RVR = PAM / FSR$ ^[15].

3.9 Avaliação do perfil oxidativo

3.9.1 Dosagem de peróxidos urinários

Os peróxidos são encontrados em todos os fluídos 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 ^[17].

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: $Fe^{2+} + ROOH \rightarrow Fe^{3+} + RO + OH^-$

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 ($\alpha = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). 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 μ M de xilenol laranja; 4 mM de BHT (2[6] – di-ter-butil-p-cresol); 25 mM da solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4); 250 μ M de sulfato ferroso de amônio (Vetec Química- RJ, Brasil).

A resultante da somatória dos reagentes acima consiste na solução FOX. Na etapa seguinte, 100 μ l da amostra urinária foi acrescentada em 900 μ l 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 ^[17]. Os valores foram estabilizados por grama de creatinina urinária e expressos por nmol de peróxidos/grama creatinina.

3.9.2 Determinação de nitrato urinário

A síntese de óxido nítrico (NO) foi avaliada por meio da quantificação de nitrato (NO_3^-), 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 150 μ l da amostra urinária dos diversos grupos foi adicionada a 150 μ l 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 nitrato de sódio ($NaNO_3$) na concentração de 0,1 a 1,0 M ^[18].

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.

3.9.3 Dosagem 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 ^[19].

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 absorvância 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 ^[19].

3.9.4 Análise de tióis solúveis não protéicos no tecido renal

O mais relevante composto tiólico presente em sistemas biológicos é a glutathiona (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 sulfidril 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 ^[20].

A quantificação dos tióis foi realizada a partir de amostras do tecido renal trituradas e homogeneizadas com solução 10 mM 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 debris teciduais. Uma alíquota foi reservada para dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford, por meio do uso do kit Bio Rad, e outra alíquota foi utilizada para dosagem dos tióis solúveis ^[20]. 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 absorvância

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 serão 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 Tukey. Os valores $p < 0,05$ foram considerados significantes.

6 RESULTADOS

Os animais do grupo Citrato apresentaram resultados que foram considerados como padrão de normalidade para os parâmetros analisados a seguir.

6.1 Parâmetros fisiológicos

Como apresentado na Tabela 1, os grupos diabéticos: DM, DM+I/R e DM+I/R+Curcumina apresentaram parâmetros de glicemia distintos, quando comparados ao grupo Citrato durante as quatro semanas. Os grupo DM, DM+I/R e DM+I/R+Curcumina apresentaram evolução semelhante no parâmetro mencionado e mantiveram diferença linear com o grupo Citrato..

Tabela 1. Acompanhamento semanal da glicemia dos grupos Citrato, DM, DM+I/R e DM+I/R+Curcumina. São Paulo 2019.

Grupos	n	Inicial - 48h	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
Citrato	5	86,67± 3,74	89,67± 8,26	97,33 ± 10,70	86,17 ± 11,57	95,67 ± 7,66
DM	5	374,60 ± 51,29 ^a	389,25 ± 76,19 ^a	389,75 ± 91,22 ^a	380,75 ± 84,01 ^a	390,00 ± 58,03 ^a
DM+I/R	5	342,57± 57,43 ^a	342,00± 67,89 ^a	334,71 ± 37,46 ^a	374,57 ±78,08 ^a	345,86 ± 57,20 ^a
DM+I/R+Curcumina	5	330,71± 63,30 ^a	349,43± 43,28 ^a	346,43 ± 55,65 ^a	335,14 ± 66,61 ^a	311,29 ± 66,46 ^a

^a p<0,05 *versus* Citrato; ^b p<0,05 *versus* DM; ^c p<0,05 *versus* DM+I/R

Na avaliação de peso dos animais, os grupos DM, DM+I/R e DM+I/R+Curcumina apresentaram uma manutenção do peso ao longo das quatro semanas quando comparados ao grupo Citrato, conforme demonstrado na Tabela 2. O grupo DM+I/R apresentou leve variação na primeira e quarta semana quando comparado ao grupo Citrato e DM.

Tabela 2. Acompanhamento semanal do peso dos grupos Citrato, DM, DM+I/R e DM+I/R+Curcumina. São Paulo 2019.

Grupos	n	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
Citrato	5	278,40± 57,53	305,60 ± 59,92	343,00 ± 48,66	366,00 ± 53,84
DM	5	281,50± 9,04	274,00 ± 9,56	271,75 ± 12,97 ^a	246,75 ± 15,63 ^a
DM+I/R	5	216,14± 21,79 ^{ab}	233,00 ± 35,21 ^a	242,66 ± 41,80 ^a	281,28 ± 17,47 ^{ab}
DM+I/R+Curcumina	5	258,00± 14,07	283,67 ± 23,01	278,60 ± 17,61 ^a	309,48 ± 13,79 ^a

^a p<0,05 *versus* Citrato; ^b p<0,05 *versus* DM; ^c p<0,05 *versus* DM+I/R

Observou-se aumento no peso do rim dos animais nos grupos DM e DM+I/R quando comparados ao mesmo parâmetro do grupo Citrato (Peso rim: DM =1,85 ± 0,22, DM+I/R =1,76 ± 0,38 *vs* Citrato= 1,30 ± 0,06). Sendo que o mesmo não ocorreu no grupo tratado (Peso rim: DM+I/R+Curcumina = 1,44 ± 0,20).

Adicionalmente, a relação peso rim e peso do animal dos grupos diabéticos não tratados foi maior, comparado ao grupo Citrato (Peso rim/Peso animal: DM= 0,61 ± 0,04, DM+I/R= 0,53 ± 0,01 *vs* Citrato= 0,33 ± 0,06). A administração de Curcumina no grupo DM+I/R+Curcumina interferiu significativamente nesses parâmetros quando comparado ao grupo DM (Peso rim: DM+I/R+Curcumina = 0,47 ± 0,08 *vs* DM = 0,61 ± 0,04), conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de peso do rim e relação peso do rim/peso animal ao final dos protocolos experimentais dos grupos Citrato, DM, DM + I/R e DM+I/R+Curcumina. São Paulo 2019.

Grupos	n	Peso do rim (gramas)	Peso rim/Peso animal
Citrato	5	1,30 ± 0,06	0,33 ± 0,06
DM	5	1,85 ± 0,22 ^a	0,61 ± 0,04 ^a
DM+I/R	5	1,76 ± 0,38 ^a	0,53 ± 0,10 ^a
DM+I/R+Curcumina	5	1,44 ± 0,20	0,47 ± 0,08 ^{ab}

^a p<0,05 *versus* Citrato; ^b p<0,05 *versus* DM; ^c p<0,05 *versus* DM+I/R

Os dados apresentados na Tabela 4 apontam que o grupo DM demonstrou maior ingestão de ração e água somente quando comparado ao grupo Citrato (Ração: DM= 35,4 ± 0,89 *vs* Citrato= 23,00 ± 1,73; Água: DM= 88,00 ± 13,04, *vs* Citrato= 22,5 ± 2,89). Houve aumento no padrão de ingesta de ração e água do grupo DM+IR+Curcumina quando comparado aos animais dos grupos DM e Citrato (Ração: DM+I/R+Curcumina = 20,73 ± 8,30 *vs* DM= 35,4 ± 0,89, Citrato= 23,00 ± 1,73; Água: DM+I/R+Curcumina = 59,17 ± 15,63 *vs* DM= 88,00 ± 13,04, Citrato = 22,5 ± 2,89). Já no grupo DM+I/R, evidenciou-se o aumento de ingestão de ração se comparado aos grupos Citrato e DM, e aumento na ingestão de água se contrastado com o grupo DM. (Ração: DM+I/R= 19,78 ± 9,44 *vs* DM= 35,4 ± 0,89, Citrato= 23,00 ± 1,73; Água: DM+I/R= 35,00 ± 20,00 *vs* DM= 88,00 ± 13,04). A administração de Curcumina não interferiu significativamente nos parâmetros quando comparados.

Tabela 4. Parâmetros de ingesta de ração e água em 24h dos grupos Citrato, DM, DM + I/R e DM+I/R+Curcumina. São Paulo 2019.

Grupos	n	Ração (gramas)	Água (ml)
Citrato	5	23,00 ± 1,73	22,50 ± 2,89
DM	5	35,40 ± 0,89 ^a	88,00 ± 13,04 ^a
DM+I/R	5	19,78 ± 9,44 ^{ab}	35,00 ± 20,00 ^b
DM+I/R+Curcumina	5	20,73 ± 8,30 ^{ab}	59,17 ± 15,63 ^{ab}

^a p<0,05 *versus* Citrato; ^b p<0,05 *versus* DM; ^c p<0,05 *versus* DM+I/R

6.2 Função renal

A função renal foi avaliada de acordo com os parâmetros de fluxo urinário, creatinina sérica e *clearance* de inulina, sendo que o grupo Citrato apresentou valores que foram considerados como referência de normalidade (Fluxo urinário: $0,011 \pm 0,003$, creatinina sérica: $0,28 \pm 0,05$ e *clearance* de inulina: $0,91 \pm 0,26$).

Nos grupos diabéticos, DM e DM+I/R+Curcumina, observou-se o aumento do fluxo urinário na comparação com o Citrato e ao comparar os grupos DM+IR e DM constata-se a diminuição do fluxo após o insulto I/R nos diabéticos. Comparando o grupo tratado DM+I/R+Curcumina em relação aos DM+I/R, nota-se a aumento do fluxo urinário próximo aos níveis de normalidade, mesmo com a presença do insulto I/R.

Quanto à mensuração de creatinina sérica, observou-se aumento nos grupos diabéticos em relação ao grupo Citrato. O grupo DM+I/R apresentou aumento adicional deste parâmetro quando comparado ao grupo DM e Citrato. O tratamento com Curcumina reduziu essa variável em relação ao grupo DM+I/R não tratado.

Adicionalmente, o *clearance* de inulina mostrou redução nos grupos diabéticos (DM, DM+I/R, DM+I/R+Curcumina) em relação ao Citrato. Esta diminuição foi mais acentuada no grupo DM+I/R em comparação aos demais grupos DM. O grupo DM+I/R+Curcumina mostrou melhora nessa variável ao grupo DM+I/R.

Tabela 5. Função renal dos grupos Citrato, DM, DM+I/R e DM+I/R+Curcumina. São Paulo 2019.

Grupos	n	Fluxo urinário 24 horas (ml/min)	Creatinina sérica (mg/dl)	<i>Clearance</i> de inulina (ml/min)
Citrato	5	$0,011 \pm 0,003$	$0,28 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,26$
DM	5	$0,056 \pm 0,010^a$	$1,08 \pm 0,14^a$	$0,58 \pm 0,04^a$
DM+I/R	5	$0,011 \pm 0,005^b$	$2,76 \pm 0,67^{ab}$	$0,15 \pm 0,06^{ab}$
DM+I/R+Curcumina	5	$0,025 \pm 0,005^{abc}$	$0,93 \pm 0,12^{ac}$	$0,44 \pm 0,11^a$

^a $p < 0,05$ versus Citrato; ^b $p < 0,05$ versus DM; ^c $p < 0,05$ versus DM+I/R

6.3 Hemodinâmica global e renal

A avaliação da hemodinâmica renal foi realizada por meio da verificação da FSR e

RVR considerando a PAM e FC. O grupo Citrato foi considerado controle de normalidade para os parâmetros mencionados, sendo que a FC e PAM apresentaram discreta variabilidade entre os grupos, sem significância estatística.

O FSR foi reduzido nos animais DM, DM+I/R e DM+I/R+Curcumina, em relação ao grupo Citrato, sendo que o grupo DM+I/R, apresentou os valores de FSR mais comprometidos na comparação com o DM. Adicionalmente, a administração de Curcumina promoveu um aumento do FSR comparado aos animais DM+I/R, que não receberam esta intervenção.

Os animais DM, DM+I/R e DM+I/R+Curcumina tiveram aumento da RVR quando comparados ao grupo Citrato. A presença do insulto de I/R agravou os valores da RVR em comparação ao grupo DM. Já os animais do grupo DM+I/R+Curcumina apresentaram diminuição dos valores de RVR em relação ao grupo DM+I/R, como exposto na tabela 6.

Tabela 6. Hemodinâmica renal dos grupos Citrato, DM, DM+I/R e DM+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)
Citrato	5	460,00± 55,74	96,86 ± 8,61	8,06 ± 1,25	11,35 ± 1,91
DM	5	471,20± 22,69	118,00 ± 25,76	4,80 ± 0,37 ^a	26,69 ± 6,80 ^a
DM+I/R	5	499,50± 40,67	94,67 ± 4,97	2,21 ± 0,34 ^{ab}	43,49 ± 5,69 ^{ab}
DM+I/R+Curcumina	5	522,33± 28,81	98,92 ± 11,61	5,10 ± 1,13 ^{ac}	20,90 ± 2,02 ^{ac}

^a p<0,05 versus Citrato; ^b p<0,05 versus DM; ^c p<0,05 versus DM+I/R

6.4 Perfil oxidativo

Os animais do grupo Citrato apresentaram resultados que foram considerados como referência de normalidade para os parâmetros oxidativos analisados a seguir.

A excreção de peróxidos urinários demonstrou elevação nos grupos diabéticos quando comparados ao grupo Citrato. A indução de I/R acarretou uma elevação adicional nesse parâmetro em relação ao grupo DM. A administração de Curcumina promoveu menor excreção de peróxidos quando comparados grupos DM+I/R e DM+I/R e DM+IR+

Curcumina.

Os animais DM, DM+I/R e DM+I/R+Curcumina apresentaram aumento dos TBARS em relação ao grupo Citrato. O grupo DM+I/R mostrou elevação significativa dessa variável quando comparado ao grupo DM. Essa alteração foi significativamente menor no grupo DM+I/R+Curcumina.

Os grupos diabéticos apresentaram elevação significativa do NO, demonstrado pelo aumento de nitrato urinário, quando comparados ao grupo Citrato, principalmente o grupo DM+I/R, que apresentou elevação do parâmetro em relação ao grupo DM. A administração de Curcumina induziu menor excreção de NO quando esse grupo foi comparado com o grupo DM+I/R.

O consumo de tióis mostrou elevação nos grupos diabetizados quando comparado aos animais Citrato. O grupo DM+I/R demonstra que o insulto de I/R causou maior consumo de reserva antioxidante do que no grupo DM. O tratamento com Curcumina no grupo DM+I/R+Curcumina elevou os tióis em relação ao grupo DM+I/R.

Tabela 7. Perfil oxidativo dos grupos Citrato, DM, DM+I/R e DM+I/R+Curcumina. São Paulo 2019.

Grupos	n	Peróxidos	Peroxidação	Nitrato urinário (µM/g de creatinina Urinária)	Tióis no tecido renal (nmol/mg de proteínas totais)
		urinários (nmol/g de creatinina urinária)	lipídica (nmol/g de creatinina urinária)		
Citrato	5	0,90 ± 0,12	0,29 ± 0,05	22,01 ± 5,84	25,98 ± 2,87
DM	5	3,59 ± 0,38 ^a	10,45 ± 0,46 ^a	51,70 ± 10,45 ^a	15,52 ± 2,45 ^a
DM+I/R	5	5,85 ± 0,25 ^{ab}	23,29 ± 2,30 ^{ab}	165,83 ± 13,56 ^{ab}	11,01 ± 2,16 ^{ab}
DM+I/R+Curcumina	5	1,80 ± 0,48 ^{abc}	9,13 ± 2,40 ^{ac}	60,51 ± 10,87 ^{ac}	19,86 ± 2,77 ^{ac}

^a p<0,05 *versus* Citrato; ^b p<0,05 *versus* DM; ^c p<0,05 *versus* DM+I/R

7 DISCUSSÃO

As complicações da função renal, hemodinâmica renal e perfil oxidativo decorrentes do DM foram reproduzidas no modelo experimental de diabetização induzida por STZ. Adicionalmente, a realização com êxito do insulto agudo por I/R nos animais diabéticos e o

papel renoprotetor da Curcumina neste modelo foram comprovados pelos resultados demonstrados.

O modelo de DM realizado, que consiste na administração de um quimioterápico capaz de degradar as células beta presentes nas ilhotas de langerhans no pâncreas, foi confirmado pelos resultados obtidos a partir do controle glicêmico semanal, promovendo a hiperglicemia sustentada, característica do DM. Essa hiperglicemia sustentada está relacionada ao desenvolvimento de complicações tanto microvasculares quanto macrovasculares.

A presença do DM se configura como um fator de risco para instalação do insulto agudo por I/R. A I/R promove redução da função renal com comprometimento volêmico causando lesões tubulares e vasculares ^[5,6]. Conforme apresentado no presente estudo, os animais diabéticos submetidos a I/R apresentaram comprometimento adicional da função renal demonstrado pela redução de *clearance* de inulina, marcador de função renal considerado padrão ouro na pesquisa básica. Adicionalmente, a creatinina sérica, um marcador clínico de disfunção renal, apresentou elevação, corroborando os achados em outros estudos experimentais com o mesmo modelo de lesão aguda ^[6, 10].

As lesões tubulares durante a I/R se relacionam a mecanismos de produção de EROs e alterações hemodinâmicas que foram demonstrados neste estudo, onde os animais submetidos a I/R tiveram aumento dos metabólitos oxidativos e nitrosativos (peróxidos, TBARS, nitrato urinário) e apresentaram comprometimento da hemodinâmica renal (diminuição do fluxo sanguíneo renal e aumento da resistência vascular renal).

As alterações hemodinâmicas, que compreendem a diminuição do FSR e elevação da RVR observadas nos animais diabéticos do presente estudo que confirmam as disfunções decorrentes do DM. Quando essas são somadas à injúria de I/R, ocorre a acentuação de seus efeitos deletérios com maior RVR e menor FSR.

Já o estresse oxidativo tem importante papel na patogênese do DM, possivelmente decorrente da hiperglicemia sustentada, em que verifica-se a indução do metabolismo da glicose excedente por outras vias diferentes da via glicolítica, como via dos polióis e hexosaminas gerando EROs. ^[9]. Os peróxidos de hidrogênio, cuja excreção urinária demonstrou-se elevada nos animais induzidos ao DM, apresentaram elevação favorecendo a ocorrência de peroxidação lipídica, e seu consequente dano estrutural e funcional das células afetadas. O processo oxidativo suscita o consumo de reservas antioxidantes endógenas como a glutatona, que se encontra reduzida frente condições como DM, segundo demonstrado neste estudo pela redução de tióis, grupamento integrante da glutatona ^[12].

O tratamento prévio com Curcumina, um fitomedicamento com propriedades farmacológicas anti-inflamatórias e antioxidantes, interferiu nos efeitos deletérios renais presentes no DM, com o comprometimento da hemodinâmica renal pelo aumento do FSR e diminuição da RVR. Ademais, o tratamento com Curcumina, induziu resultados benéficos na diminuição de eliminação de peróxidos urinários, TBARS e com a preservação das reservas tiólicas do tecido renal.

Em suma, o DM é considerado um fator de risco modificável, sendo prevenível, de extrema relevância na atual saúde pública mundial. Este estudo reforça a importância da prevenção como método mais eficaz em saúde, e como já previsto na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, a utilização de fitomedicamentos apresenta-se como auxiliar à prevenção ou no tratamento de doenças como o DM.

Diante disto, este estudo comprovou a eficácia como agente renoprotetor da Curcumina no DM e em coexistência com I/R, tornando-se agente promissor para, após outros estudos pré-clínicos, com maior amostra e outras metodologias de avaliação de função renal, e clínicos, possa ser considerado como possibilidade terapêutica a ser incorporada na clínica de pacientes diabéticos com risco para complicação da função renal.

8 CONCLUSÃO

O tratamento prévio com Curcumina promoveu melhora da função renal de ratos diabéticos submetidos a I/R com repercussão benéfica na hemodinâmica renal e perfil oxidativo renal.

REFERÊNCIAS

1. Oliveira JEP, Montenegro Junior RM, Vencio S (Org.) Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. 1ed. São Paulo: Editora Clannad, 2017.
2. International Diabetes Federation.IDF Diabetes Atlas. 8 ed. 2017.
3. Fernandes SM, Cordeiro PM, Watanabe M, Fonseca CD, Vattimo MF. The role of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. Arch

Endocrinol Metab. 2016;60(5):443-449.

4. Zhang Y, Hu F, Wen J, Wei X, Zeng Y, Sun Y, Luo S, Sun L. Effects of sevoflurane on NF- κ B and TNF- α expression in renal ischemia-reperfusion diabetic rats. *Inflamm Res*. 2017;66(10):901-910.
5. Souza AV, Golim MA, Deffune E, Domingues MA, de Carvalho LR, Vianna IG, Castiglia YM, Vianna PT. Evaluation of renal protection from high doses of melatonin in an experimental model of renal ischemia and reperfusion in hyperglycemic rats. *Transplant Proc*. 2014;46(5):1591-3.
6. 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*. 2009;22(Especial-Nefrologia):490-3.
7. Sholze AFA. Biodisponibilidade da Curcumina. *Rev Bras Nutri Clin Func* 2014;60.
8. Ghosh SS, Massey HD, Krieg R, Fazelbhoy ZA, Ghosh S, Sica DA, Fakhry I, Gehr TW. Curcumin ameliorates renal failure in 5/6 nephrectomized rats: role of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296(5): F1146-57.
9. Sharma S, Kulkarni SK, Chopra K. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(10):940-5.
10. 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*. 2007;45(12):2366-71.
11. Vattimo MFF, da Silva NO. [Uncaria tomentosa and acute ischemic kidney injury in rats]. *Rev Esc Enferm USP*. 2011;45(1):194-8.
12. Cordeiro PM. Efeito da Justicia acuminatissima na injúria renal aguda isquêmica: estudo experimental [tese]. São Paulo; Escola de Enfermagem; 2016.
13. 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.
14. 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.
15. 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.

16. 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*. 1954; 58(3): 426–437.
17. Banerjee D, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob J. Urinary Hydrogen peroxide: a probably marker of oxidative stress in malignancy. *Clin Chim Acta*. 2003; 334(1-2):205-9.
18. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126(1): 131-8.
19. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci*. 2001; 37(3):293-303.
20. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Cell signally and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol*. 2002; 64(5-6): 1057-64.

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 “**O efeito da Curcumina na lesão por isquemia/reperfusão renal em ratos diabéticos**” registrada com o nº 1275/2019, sob a responsabilidade de **Maria de Fátima Fernandes Vattimo** e **Douglas Ikedo Machado**, 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 reunião de 27.03.19

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-03-2019 Término: 01-03-2020
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, 27 de Março de 2019

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