

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

BRUNA PINHEIRO PEREIRA

**EFEITO DA CURCUMINA NAS ALTERAÇÕES RENAIIS DA HIPERTENSÃO POR
INIBIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM RATOS**

ALFENAS/MG

2023

BRUNA PINHEIRO PEREIRA

**EFEITO DA CURCUMINA NAS ALTERAÇÕES RENAIS DA HIPERTENSÃO POR
INIBIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM RATOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador (a): Profa. Dra. Carla Speroni Ceron.

Coorientador (a): Prof. Dr. Marcos Vinícius Salles Dias.

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Pereira, Bruna Pinheiro .

Efeito da curcumina nas alterações renais da hipertensão por inibição de óxido nítrico em ratos. / Bruna Pinheiro Pereira. - Alfenas, MG, 2023. 85 f. : il. -

Orientador(a): Carla Speroni Ceron.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Hipertensão arterial. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Metaloproteinases. 4. Curcumina. 5. Alterações renais. I. Ceron, Carla Speroni, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

BRUNA PINHEIRO PEREIRA**"EFEITO DA CURCUMINA NAS ALTERAÇÕES RENAIS DA HIPERTENSÃO POR INIBIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM RATOS"**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 10 de fevereiro de 2023.

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron
Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Gabriel Tavares do Vale
Universidade do Estado de Minas Gerais

Prof. Dr. Evandro Manoel Neto Neves
Universidade Federal do Espírito Santo

Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues
Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco
Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Carla Speroni Ceron, Usuário Externo**, em 10/02/2023, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evandro Manoel Neto Neves, Usuário Externo**, em 10/02/2023, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Helena Lobo Torres Pacheco, Professor do Magistério Superior**, em 10/02/2023, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Rita Rodrigues, Professor do Magistério Superior**, em 10/02/2023, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Tavares do Vale, Usuário Externo**, em 10/02/2023, às 17:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0918710** e o código CRC **E2D64BC1**.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, Aquele que é o sentido de tudo para mim, à Virgem Maria, que é e sempre foi meu amparo e consolo em tantos momentos durante a realização deste estudo, e à minha família, que sempre acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, O qual é a minha felicidade e a Verdade que me ilumina pela busca da Sabedoria.

À Virgem Maria, minha Mãe e Senhora, por ser constantemente insistente comigo e me conduzir a todo instante.

À minha mãe Adriana, por ser um exemplo em tantos aspectos e por se dedicar tanto por mim e por meus irmãos. Sem você eu não teria chegado até aqui.

Ao meu pai Cláudio, por ter feito e ainda fazer de tudo para que busquemos nossos sonhos e por me ensinar sempre a ser uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos Amanda e Matheus, por me apoiarem e acreditarem sempre tanto em mim.

À Comunidade Mariana Resgate, por ser a segunda família que Deus me proporcionou ter em Alfenas, por este carisma que me conduz em direção à Verdade, e por sempre me apontarem o céu.

Aos meus amigos, especialmente aqueles que viveram comigo de perto todo este doutorado e que me deram tanto suporte para que eu permanecesse até o fim.

À Universidade Federal de Alfenas, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por me permitirem realizar mais essa etapa e por todo conhecimento que me foi proporcionado todos esses anos.

Ao LAFEC, por me permitir escrever parte de minha história ali e me impulsionarem a amar ainda mais a farmacologia.

A todos os companheiros de laboratório, por serem meu auxílio e suporte sempre quando precisei.

À FAPEMIG, por todo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos os alunos e professores, que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

À minha orientadora, Prof. Dra. Carla Speroni Ceron, por acreditar em meu potencial e insistir tanto para que eu não desistisse, me auxiliando a concretizar algo que muitas vezes me pareceu impossível.

E a todos também que aqui não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para que este projeto fosse concretizado, muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A hipertensão arterial é uma condição clínica que seu aumento crônico pode levar ao desenvolvimento de inúmeras alterações renais, sendo que as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as metaloproteinases de matriz (MMPs) participam diretamente. A curcumina é um antioxidante natural que tem sido extensivamente estudado na literatura, porém, os mecanismos relacionados à prevenção das alterações renais promovidas pela utilização de curcumina no modelo de hipertensão induzida pelo inibidor das sintases de óxido nítrico (L-NAME) ainda permanecem obscuros. Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da curcumina sobre as alterações renais e sobre o aumento de MMPs e ERO na hipertensão arterial experimental. A hipertensão arterial foi induzida pelo tratamento com L-NAME e os animais controles e hipertensos foram tratados com curcumina ou veículo [grupos: CV (Controle + Veículo); CC (Controle + Curcumina); LV (L-NAME + Veículo); L100 (L-NAME + Curcumina 100); L50 (L-NAME + Curcumina 50)]. Ao final dos protocolos, o sangue e os rins foram coletados e utilizados para determinar os parâmetros de função renal, assim como alguns experimentos de estresse oxidativo, de determinação dos níveis de MMPs e expressão de ED1. A hipertensão induzida por L-NAME promoveu um aumento na pressão arterial dos animais, nos níveis de creatinina, nos níveis de MMP-9, na atividade de MMP-2, e na expressão de ED1. O tratamento com curcumina atenuou os níveis de creatinina, MMP-2 e MMP-9, a expressão de ED1, promoveu um aumento na atividade da enzima antioxidante SOD e no número de glomérulos no tecido renal. Assim, o tratamento com curcumina atenuou as alterações renais causadas pela hipertensão induzida por L-NAME, com consequente melhora da função renal destes animais.

Palavras-chave: Hipertensão arterial; Espécies reativas de oxigênio; Metaloproteinases; Curcumina; Alterações renais.

ABSTRACT

Arterial hypertension is a clinical condition that leads to the development of several renal alterations, in which reactive oxygen species (ROS) and matrix metalloproteinases (MMPs) directly participate. Curcumin is a natural antioxidant that has been extensively studied in the literature. However, the mechanisms related to the prevention of renal alterations promoted by curcumin use in the model of induced hypertension by the inhibitor of nitric oxide synthases (L-NAME) remain unclear. Therefore, the objective of the present study is to evaluate the curcumin effects on renal alterations and on MMPs and ROS increase in the experimental arterial hypertension. Arterial hypertension was induced by L-NAME treatment and the animals from both control and hypertension groups were treated with curcumin or vehicle [groups: CV (Control + Vehicle); CC (Control + Curcumin); LV (L-NAME + Vehicle); L100 (L-NAME + Curcumin 100); L50 (L-NAME + Curcumin 50)]. By the end of protocols, blood and kidneys were collected and used to determine renal function parameters as well as some oxidative stress, MMPs levels and ED1 expression experiments. L-NAME induced hypertension promoted an increase in blood pressure, creatinine levels, MMP-9 levels, MMP-2 activity, and ED1 expression. The curcumin treatment attenuated creatinine levels, MMP-2 expression, MMP-9 levels, ED1 expression and promoted an increase in the activity of the antioxidant enzyme SOD and in the number of glomeruli in the renal tissue. Thus, the curcumin treatment attenuated renal alterations caused by L-NAME induced hypertension with an improvement of renal function in these animals.

Keywords: Arterial hypertension; Reactive oxygen species; Metalloproteinases; Curcumin; Renal alterations.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Complicações causadas pela hipertensão arterial . **Erro! Indicador não definido.**22
- Figura 2 - Funções fisiológicas do NO (Óxido Nítrico) nos rins**Erro! Indicador não definido.**3
- Figura 3 - Estrutura geral das gelatinases MMP-2 e MMP-9. Apenas a MMP-9 possui a região semelhante ao colágeno do tipo V **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4 - Formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5 - Estrutura química da curcumina **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6 - Contagem de glomérulos por campo42
- Figura 7 - Pressão arterial (mmHg) dos animais **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8 - Peso corporal (g) dos animais **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 9 – Ureia e soro (mg/dL)..... **Erro! Indicador não definido.**5
- Figura 10 - Creatinina em soro (mg/dL)..... **Erro! Indicador não definido.**6
- Figura 11 - Efeito do uso da curcumina sobre a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecido renal (nmol/mg proteína) e em plasma (nmol/L)..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12 - Efeito do uso da curcumina sobre os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no tecido renal (nmol/mg proteína) **Erro! Indicador não definido.**8
- Figura 13 - Efeito do uso da curcumina sobre a produção de ânion superóxido (O₂^{•-}) através da utilização da sonda lucigenina no tecido renal (RLU/mg proteína)**Erro! Indicador não definido.**9
- Figura 14 - Efeito do uso da curcumina sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no tecido renal (% Inibição/mg proteína)50
- Figura 15 - Efeito do uso da curcumina sobre a atividade da catalase (CAT) no tecido renal (U/mg proteína) **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 16 - Efeito do uso da curcumina sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido renal (µg/mg tecido) 52
- Figura 17 - Efeito do uso da curcumina sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido renal (U/mg proteína) **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 18 - Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de metaloproteinases de matrix do tipo 2 (MMP-2) por *Western blotting* (unidades arbitrárias)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 19 - Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de metaloproteinases de matrix do tipo 9 (MMP-9) por *Western blotting* (unidades arbitrárias)..... **Erro! Indicador nã**

Figura 20 - Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de inibidores teciduais (TIMP-2) por *Western blotting* (unidades arbitrárias)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 21 - Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de anticorpo monoclonal para CD68 (ED1) por *Western blotting* (unidades arbitrárias)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 22 - Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de SOD-1 por *Western blotting* (unidades arbitrárias)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 23 - Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de MMP-2 por zimografia (unidades arbitrárias)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 24 - Histologia do tecido renal direito para determinação do número de glomérulos por área..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CaCl ₂	Cloreto de Sódio
CAT	Catalase
CV	Controle + Veículo
CC	Controle + Curcumina
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico)
ED1	Anticorpo monoclonal para macrófagos CD68
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FTG	Feedback Tubuloglomerular
GCs	Guanilil Ciclase Solúvel
GPMc	Monofosfato de Guanosina Cíclico
GO	Glicose Oxidase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona dissulfeto
GTP	Trifosfato de Guanosina
HE	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
KCL	Cloreto de cálcio
KH ₂ PO ₄	Dihidrofosfato de potássio
LC50	L-NAME + Curcumina 50
LC100	L-NAME + Curcumina 100
LN	L-NAME + Veículo
L-NAME	N-nitro-arginina-metil-éster

MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MMP-2	Metaloproteinase do tipo 2
MMP-9	Metaloproteinase do tipo 9
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaF	Fluoreto de Sódio
NaHCO ₃	Carbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
nNOS	NO Sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	NO sintase
•NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NO ₂ ⁻	Ânion dióxido de azoto
NOX4	NADPH oxidase 4
OH•	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO-	Peroxinitrito
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
PKG	Proteína Quinase G
SOD	Superóxido dismutase
SOD-1	Superóxido dismutase citoplasmática
SOD-2	Superóxido dismutase mitocondrial
SOD-3	Superóxido dismutase extracelular
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TIMP-1	Inibidor tecidual de MMP do tipo 1
TIMP-2	Inibidor tecidual de MMP do tipo 2
TIMP-3	Inibidor tecidual de MMP do tipo 3
TIMP-4	Inibidor tecidual de MMP do tipo 4
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	A HIPERTENSÃO ARTERIAL NA SOCIEDADE.....	20
2.2	O PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	21
2.3	FUNÇÕES DO ÓXIDO NÍTRICO NOS RINS.....	22
2.4	AS METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SUAS IMPLICAÇÕES RENAIS.....	25
2.5	ESTRESSE OXIDATIVO NAS ALTERAÇÕES RENAIAS.....	27
2.6	O USO DA CURCUMINA PODE LEVAR A UMA REDUÇÃO DOS DANOS RENAIAS.....	30
3	OBJETIVO GERAL.....	33
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	JUSTIFICATIVA.....	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	35
5.2	INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO PELA TÉCNICA L-NAME.....	35
5.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	36
5.4	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL.....	36
5.5	AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	37
5.6	DETERMINAÇÃO DE H ₂ O ₂	37
5.7	DETECÇÃO DE O ₂ •-.....	38
5.8	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	38
5.8.1	Determinação da atividade tecidual da SOD.....	38
5.8.2	Determinação da atividade tecidual da CAT.....	38
5.8.3	Determinação dos níveis teciduais da GSH.....	39
5.9	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	39
5.10	WESTERN BLOTTING.....	40
5.11	ZIMOGRAFIA.....	40
5.12	AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA RENAL.....	41

5.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	
6	RESULTADOS.....	
6.1	PRESSÃO ARTERIAL.....	43
6.2	PESO CORPORAL.....	44
6.3	UREIA.....	44
6.4	CREATININA.....	45
6.5	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	46
6.6	DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂).....	48
6.7	DETECÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO (O ₂ •-).....	48
6.8	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	49
6.8.1	Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	49
6.8.2	Determinação da atividade da catalase (CAT).....	50
6.8.3	Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH).....	51
6.9	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO).....	52
6.10	WESTERN BLOTTING.....	53
6.10.1	<i>Western Blotting</i> de MMP-2.....	53
6.10.2	<i>Western Blotting</i> de MMP-9.....	54
6.10.3	<i>Western Blotting</i> de TIMP-2.....	55
6.10.4	<i>Western Blotting</i> de ED1.....	56
6.10.5	<i>Western Blotting</i> de SOD-1.....	57
6.11	ZIMOGRAFIA DE MMP-2.....	58
6.12	AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA RENAL.....	60
7	DISCUSSÃO.....	63
8	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	ANEXO A.....	85

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é considerada um fator de risco primário para doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, podendo ocorrer em todas as idades e em ambos os sexos, sendo também conhecida como um “mal silencioso” devido à ausência de sinais precoces de seu desenvolvimento. Segundo a World Health Organization (2021), há cerca de 1,28 bilhões de adultos entre 30 e 79 anos que apresentam esta patologia, e apenas uma a cada cinco pessoas a tem sob controle. A elevação da pressão arterial pode causar, entre outras coisas, estresse oxidativo e ativação de vias proteolíticas que contribuem para disfunções e lesões renais (GONZÁLES *et al.*, 2014).

Pesquisadores em todo mundo vêm estudando as funções biológicas do óxido nítrico (NO). Nesse sentido, ratos tratados com N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), um potente inibidor da síntese de NO, constituem um modelo bastante utilizado de hipertensão arterial sistêmica (RIBEIRO *et al.*, 1992). Sabe-se que a administração de L-NAME leva a hipertensão persistente e lesão renal caracterizada por glomeruloesclerose (lesões nos podócitos dos glomérulos renais), isquemia glomerular e infiltrado intersticial renal 9proovendo a inflamação dos túbulos renais) (BAYLIS *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1992).

Após algumas semanas de inibição da NO sintase (NOS), observa-se nefrosclerose (danos graves ao néfrons e desenvolvimento de necrose), isquemia, infiltrado intersticial, alterações microvasculares renais e albuminúria progressiva (ZATS; BAYLIS, 1998). Em fases mais avançadas, nota-se depressão da função renal e microangiopatia renal (formação de trombos na microvasculatura) com características funcionais e morfológicas de hipertensão maligna (RIBEIRO *et al.*, 1992).

As alterações renais podem ser causadas devido a vários fatores, como por meio das metaloproteinases de matriz e do estresse oxidativo. As metaloproteinases de matriz (MMPs), também conhecidas como “matrixinas”, são enzimas que fazem parte de uma superfamília de endopeptidases, possuindo como característica o fato de serem dependentes de cálcio e possuírem zinco em sua constituição, além de terem a capacidade de degradar inúmeros componentes da matriz extracelular (MURPHY; NAGASE, 2008; QUINTERO-FÁBIAN *et al.*, 2019). As MMPs em condições fisiológicas são bastante relevantes nos processos de remodelamento de tecidos, porém seu aumento de maneira desordenada pode estar relacionado

a vários processos patológicos, principalmente devido a aumentar a passagem de células inflamatórias e tumorais através do endotélio (HU *et al.*, 2007; KURZEPA *et al.*, 2014a). A MMP-2 e a MMP-9 são gelatinases que se encontram localizadas nas células da camada íntima e média dos vasos, sendo que a expressão da MMP-2 é de maneira constitutiva, e da MMP-9 é de maneira induzida (HU *et al.*, 2007; NEWBY, 2006).

Segundo a literatura, a atividade das MMPs pode ser controlada por diversos fatores como citocinas, hormônios, fatores de crescimento e estresse oxidativo (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Para que estas enzimas possam ser reguladas, há diversos níveis que podem ser considerados; porém, três formas se destacam: pela indução da transcrição gênica, por meio da modificação após a etapa de tradução, e pela interação das MMPs com seus inibidores teciduais endógenos, os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) (GUIMARÃES *et al.*, 2010; KURZEPA *et al.*, 2014a). Em condições normais, existe um equilíbrio entre a razão de MMPs e TIMPs, uma vez que os TIMPs mantêm o equilíbrio entre a formação da matriz extracelular e sua destruição (ZAKIYANOV *et al.*, 2019). Entretanto, quando há processos patológicos como a hipertensão arterial, ocorre um desequilíbrio dessa relação, podendo levar à degradação excessiva das proteínas da matriz extracelular e ao desenvolvimento do remodelamento vascular patológico (PRADO *et al.*, 2021). Dentre as principais enzimas proteolíticas envolvidas neste processo, a MMP-2 e a MMP-9 têm demonstrado um papel significativo no progresso das doenças cardiovasculares devido à sua capacidade em degradar proteínas da matriz extracelular (como a elastina e o colágeno), podendo contribuir com o desenvolvimento de doenças como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, doença cardíaca isquêmica, aneurismas vasculares e hipertensão (GUIMARÃES *et al.*, 2010; PRADO *et al.*, 2021).

Em relação ao estresse oxidativo, este é definido como um dano tissular causado pelo desequilíbrio entre os fatores pró e antioxidantes. Ele está presente em uma grande variedade de condições patológicas e acredita-se que funcione como agente patogênico em muitas dessas condições. Evidências demonstram que as espécies reativas de oxigênio (ERO) desempenham um papel extremamente importante no desenvolvimento de inúmeras doenças renais relacionadas à hipertensão (GONZÁLES *et al.*, 2014). Diversas alterações renais podem se desenvolver com a falta de tratamento da hipertensão, e quanto às alterações glomerulares, o estresse oxidativo está diretamente relacionado ao desenvolvimento da glomerulopatia lipoproteica, além de outras lesões glomerulares inflamatórias (RODRIGO; RIVERA, 2002).

Quanto aos danos no interstício e túbulo, um dos principais mecanismos é por meio da exposição das células tubulares a proteínas de baixa densidade, que podem levar ao

desenvolvimento de danos tubulares através da produção de ERO pela enzima NADPH oxidase (PICCOLI *et al.*, 2011).

Para então buscar-se uma diminuição dos danos renais causados pelas alterações promovidas pela hipertensão arterial, uma possibilidade seria o composto curcumina, o qual faz parte do grupo dos polifenóis (moléculas bastante presentes em plantas, e que fazem parte da dieta, sendo a curcumina um flavonoide) de coloração amarela intensa, isolado da planta *Curcuma longa* Linn. (Zingiberaceae) que é cultivada em regiões tropicais, sendo uma substância muito utilizada como especiaria na culinária, e apresentando diversas ações farmacológicas descritas em vários estudos (BOONLA *et al.*, 2014; CORREA *et al.*, 2013). Sua produção ocorre em quase todas as regiões do Brasil, sendo os estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás os maiores produtores (FARIA, 2012).

O efeito anti-hipertensivo da curcumina foi avaliado em diferentes modelos experimentais (BOONLA *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2017). Os mecanismos associados aos efeitos benéficos da curcumina na hipertensão ainda não estão totalmente esclarecidos, porém já foi descrito que este polifenol pode atenuar a disfunção endotelial, aumentar biodisponibilidade do óxido nítrico, diminuir o estresse oxidativo, e levar a alterações epigenéticas que resultam em menor ativação de fatores pró-fibróticos, incluindo MMP-2 (BOONLA *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2017).

Assim, a partir do que foi exposto, ainda se fazem necessários novos estudos sobre a ação da curcumina nas alterações renais decorrentes da hipertensão com o objetivo de ampliar o entendimento dos mecanismos pelos quais a curcumina pode promover seus efeitos benéficos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

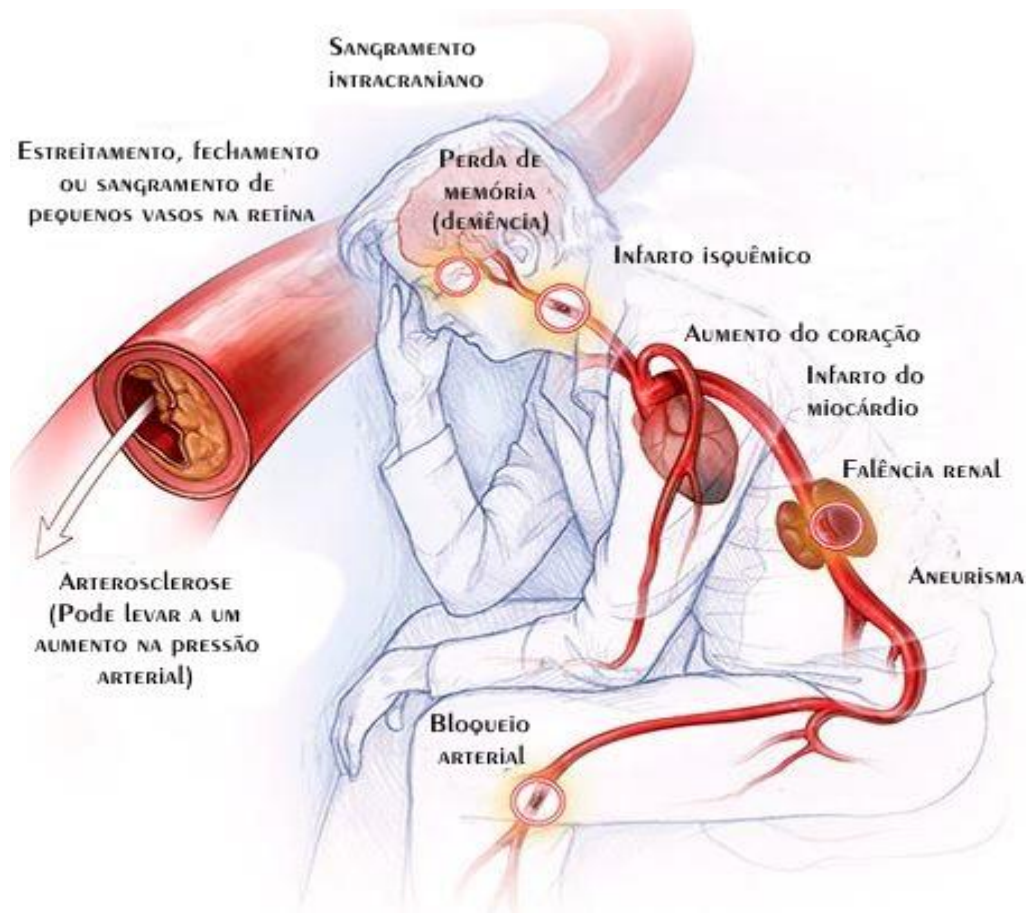
2.1 A HIPERTENSÃO ARTERIAL NA SOCIEDADE

Uma das doenças mais prevalentes e representativas no mundo contemporâneo é a hipertensão arterial. Segundo dados da World Health Organization (WHO), cerca de 17,9 milhões de óbitos ocorreram em 2019 devido a doenças cardiovasculares, sendo que 85% dos casos foram devido a infarto e derrame. Segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, a hipertensão tem como principais fatores para seu desenvolvimento os fatores genéticos, a idade, o sexo, a etnia, o sobrepeso, a ingestão elevada de sódio e potássio, o sedentarismo, o uso excessivo de álcool e fatores socioeconômicos (BARROSO *et al.*, 2021). Esta patologia possui como principal diagnóstico o aumento sustentado da pressão arterial acima de 140/90 mmHg, ou seja, pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg e pressão arterial diastólica acima ou igual a 90 mmHg (BARROSO *et al.*, 2021; GUPTA-MALHOTRA *et al.*, 2015). De acordo com o Sistema de Informação de Mortalidade do Ministério da Saúde (2020), o número de óbitos por hipertensão arterial em 2019 no Brasil foi de 53.022, enquanto que em 2006 o número foi de 36.710, demonstrando um aumento bastante significativo no número de óbitos por essa doença no país.

Além de estar relacionada a causas de óbito, a hipertensão é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tendo a doença cardíaca hipertensiva na 10^a posição do *ranking* mundial em 2012 (ANDRADE *et al.*, 2015). No ano de 2013, a prevalência de adultos residentes nas capitais brasileiras com hipertensão arterial foi de 24,1%, demonstrando a imensa importância desta doença na população (ANDRADE *et al.*, 2015).

A hipertensão arterial, por ser uma doença geralmente assintomática, pode levar ao desenvolvimento de complicações que podem ser fatais, como por exemplo aneurismas, doença arterial coronária, infarto, danos nos nervos e também danos renais, como a doença renal crônica (Figura 1) (MAYO CLINIC, 2019).

Figura 1 – Complicações causadas pela hipertensão arterial.



Fonte: Adaptado de MAYO CLINIC (2019).

A hipertensão tem acometido cerca de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, e devido a isso, tem levado a um aumento significativo no desenvolvimento de danos renais, especialmente a insuficiência renal crônica. A insuficiência renal aguda é caracterizada por súbita e rápida perda da função renal, enquanto que a insuficiência renal crônica se caracteriza por perda lenta e progressiva da função renal, o que é promovido pela hipertensão (BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Esta doença tem atingido países desenvolvidos e também subdesenvolvidos, sendo que todos os anos mais de 220.000 pessoas iniciam o tratamento de diálise (HAFEZ; ABDELLATIF; ELKHATIB, 2006).

2.2 O PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA HIPERTENSÃO ARTERIAL

O óxido nítrico (NO) é um gás presente na atmosfera em baixas quantidades, que por possuir um elétron extra, é bastante reativo (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Esta molécula no organismo tem inúmeras funções, como o controle da circulação placentária logo no período inicial de existência do ser humano, age como neurotransmissor para potencializar a memória e aprendizagem, além de ser responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo nos tecidos e no controle do extravasamento tecidual, sendo um vasodilatador importante (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

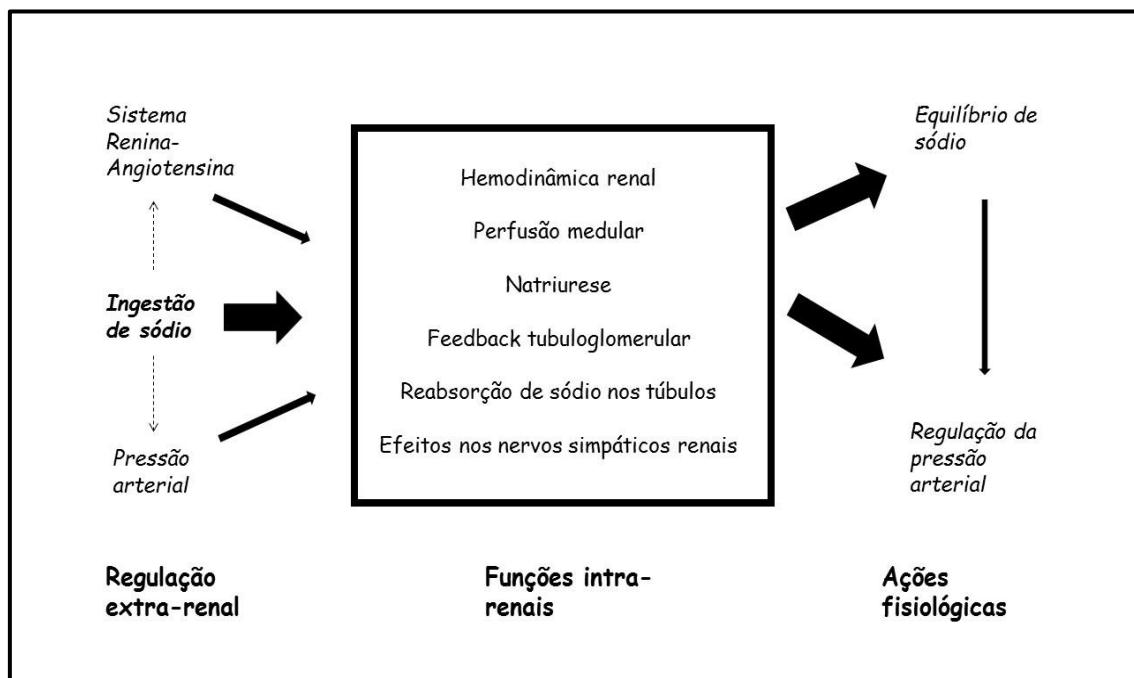
O NO é produzido no organismo através de um aminoácido chamado L-arginina, o qual é utilizado na síntese de creatinina (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). A arginina para ser produzida de maneira continuada, possui uma neo-síntese nos túbulos proximais renais a partir de uma molécula chamada citrulina (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). A síntese da citrulina pode ser bloqueada por meio de alguns análogos da L-arginina, como o L-NAME (N-nitro-L-arginina-metil-éster), o que então impediria a síntese de NO e conseqüentemente levaria a uma inibição de seus efeitos, levando a alterações vasculares como a vasoconstrição (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Esta vasoconstrição se dá devido ao fato de o NO ser sintetizado em larga escala no endotélio, o que permite uma oposição do endotélio em normotensão à vasoconstrição causada pela atividade do sistema nervoso simpático e, portanto, a inibição de sua produção não mais impediria a vasoconstrição (OLIVER *et al.*; 2014).

2.3 FUNÇÕES DO ÓXIDO NÍTRICO NOS RINS

O NO possui diversas funções conhecidas pela literatura, estando entre elas a sua capacidade de agir como neurotransmissor para potencializar a memória e aprendizagem, a sua atuação como responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo nos tecidos, além de ter o papel de controlar o extravasamento tecidual, sendo um vasodilatador bastante relevante (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). O NO também possui outra denominação como “fator relaxante derivado do endotélio”, pelo fato de induzir o relaxamento na musculatura lisa (EVORA *et al.*, 2003). Nos rins, o NO é responsável por várias funções importantes: pela natriurese e diurese, atuando como mediador da excreção de sódio e água, respectivamente; atuando na regulação da hemodinâmica renal, em que o NO possui papel importante de manter o tônus vascular renal normal; pela manutenção da perfusão medular, atuando no equilíbrio de sódio e pressão sanguínea; pelo controle do feedback tubuloglomerular (FTG), o qual é definido pela vasoconstrição da arteríola aferente resultando em uma diminuição da taxa de filtração

glomerular; pela inibição da reabsorção de sódio pelos túbulos renais; e pela intervenção na atividade neural simpática presente neste órgão (Figura 2) (MOUNT; POWER, 2006).

Figura 2 – Funções fisiológicas do NO nos rins.



Fonte: Adaptado de MOUNT, POWER (2019).

Em estudos feitos com inibição da síntese de NO, verificou-se que houve um aumento de 30 a 50% nos valores da resistência vascular renal (devido a vasoconstrição da arteríolas eferentes) e diminuição de 25 a 40% no fluxo sanguíneo renal (taxa que demonstra o sangue sistêmico que é entregue ao rim, ou seja, quanto menor, menos sangue é entregue) (MAJID; NAVAR, 2001). Além disso, o NO contribui de maneira significativa na manutenção do balanço eletrolítico, aumentando a excreção de sódio e do fluxo urinário, demonstrando o papel essencial do NO na hemodinâmica renal (BACHMANN; MUNDEL, 1994).

Quando o NO é produzido pelas óxido nítrico sintases (NOS), ele é difundido em células do músculo liso dos vasos e ativa a guanilil ciclase solúvel (GCs), a qual converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPC), promovendo a vasodilatação (AHMAD *et al.*, 2018). Além disso, a ativação do GMPC pode levar à ativação de canais iônicos, reduzindo os níveis de cálcio intracelular e abrindo os canais de potássio para promover a hiperpolarização (para relaxar o músculo liso); pode ativar a fosfodiesterase, a qual hidrolisa o AMPc; e pode ativar a proteína quinase G (PKG), a qual fosforila diferentes

proteínas envolvidas com a vasodilatação, a ativação de neutrófilos, a modulação do tônus das células musculares lisas e a expansão da matriz (AHMAD *et al.*, 2018). Nos rins, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é a maior produtora de NO, que pelo caminho NO/GCs/GMPc produz vasodilatação (AHMAD *et al.*, 2018). Uma diminuição na produção de NO ou sua inibição está relacionada ao desenvolvimento de hipertensão, devido ao fato de que há uma diminuição significativa nos seus efeitos sobre o sódio renal, a excreção de fluidos e a resistência vascular renal (AHMAD *et al.*, 2018).

Um outro sistema que pode ser ativado devido a alterações na pressão arterial é o sistema renina-angiotensina. Quando esse sistema é ativado, ocorre uma liberação de renina pelas células justaglomerulares, a qual converte seu substrato angiotensinogênio em angiotensina I, sendo posteriormente convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (HERRMANN; TEXTOR, 2019). Esta angiotensina II liberada promove a vasoconstrição e leva a liberação de aldosterona proveniente do córtex adrenal e a retenção de água e sódio, aumentando a volemia e o débito cardíaco, que contribuem para a elevação da pressão arterial (HERRMANN; TEXTOR, 2019). O estresse oxidativo promovido por esta enzima pode alterar diretamente o tônus e a função vascular, através da diminuição da biodisponibilidade e/ou sinalização do óxido nítrico; além de aumentar a proliferação e migração celular nos vasos, inflamação e apoptose, assim como alterações na matriz extracelular, ocasionando o remodelamento vascular (SCHULZ; GORI; MÜNZEL, 2011).

A capacidade dos rins em manter a pressão sanguínea e a filtração glomerular constantes ainda que ocorram alterações na pressão arterial sistêmica é chamada de autorregulação renal (JUST, 1997). O FTG é um processo essencial nesta autorregulação, pois o aumento na filtração glomerular gera um aumento de sódio na alça de Henle detectado pela mácula densa, a qual promove a sinalização para a vasoconstrição da arteríola aferente, diminuindo a filtração glomerular (MOUNT; POWER, 2006). Segundo Majid e Navar (2001), há uma alta expressão de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) na macula densa, e por isso o NO pode estar envolvido na regulação do FTG através do estímulo à GCs, produzindo GMPc e ativando a proteína quinase GMPc-dependente dentro das células da macula densa.

O fluxo medular renal está relacionado com a regulação da pressão sanguínea e com o equilíbrio de sódio (COWLEY *et al.*, 2003). O NO tem atuação direta sobre o fluxo medular renal, influenciando tanto a manutenção da pressão sanguínea quanto o equilíbrio de sódio (MOUNT; POWER, 2006). Em estudos feitos com o análogo da L-arginina L-NAME, verificou-se que houve uma diminuição em até 40% do fluxo medular renal, indicando que o NO exerce influência direta sobre os vasos presentes na medula renal (COWLEY *et al.*, 2003).

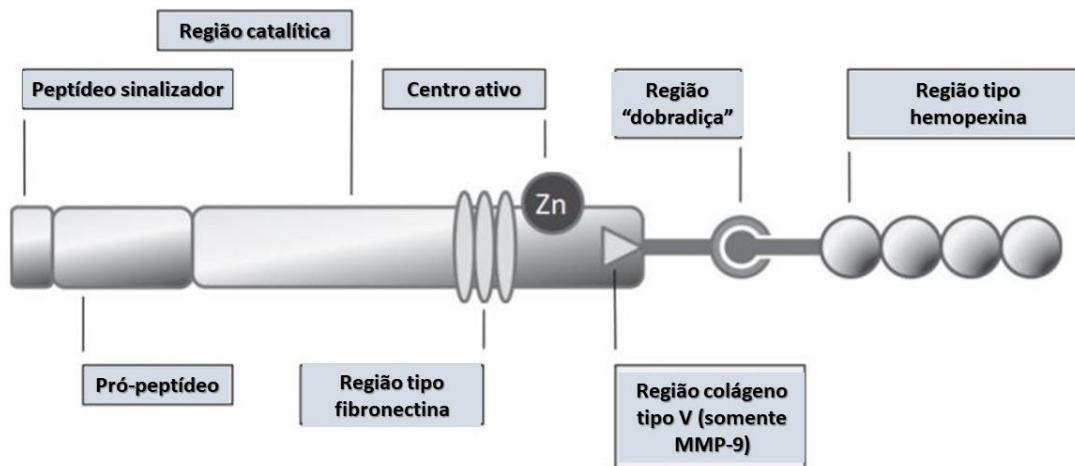
Além disso, o NO também tem ação de contrapor os efeitos vasoconstritores da noradrenalina, vasopressina e angiotensina II na medula renal, mantendo o fluxo medular normal e impedindo o desenvolvimento de hipertensão (MOUNT; POWER, 2006).

2.4 AS METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SUAS IMPLICAÇÕES RENAIAS

Conforme descrito anteriormente, as MMPs pertencem a uma família com mais de 25 enzimas relacionadas, que têm como característica serem dependentes de cálcio e possuem zinco em sua constituição, o qual é essencial para suas atividades proteolíticas, incluindo a degradação de inúmeros componentes da matriz extracelular (MURPHY; NAGASE, 2008). Esta família de proteinases inclui as colagenases, as gelatinases, as estromelinas, as matrilisinas, as MMPs do tipo membrana e também “outras” MMPs (THAIKILL; BUNN; FOWLKES, 2009; ZAKIYANOV *et al.*, 2019). As MMPs atuam no *turnover* da matriz extracelular, tendo um papel essencial na manutenção do equilíbrio de sua síntese e degradação (XU *et al.*, 2014). Este processo é essencial para morfogênese e remodelamento de tecidos sob condições normais, entretanto seu aumento pode estar relacionado a diversos processos patológicos, como doenças inflamatórias e neoplásicas (HU *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2014).

As MMPs apresentam em sua estrutura alguns elementos em comum, que são o peptídeo de sinalização, o pró-peptídeo e a região catalítica, onde se encontra presente o zinco (KURZEPA *et al.*, 2014a). As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) possuem em sua estrutura, além dos elementos em comum com as outras MMPs, a presença de um fragmento hidrofóbico envolvido em gelatina, o qual se assemelha a fibronectina do tipo II (Figura 3) (KURZEPA *et al.*, 2014b). A MMP-9 ainda possui em sua constituição uma região que se assemelha ao colágeno do tipo V, o que a diferencia das outras MMPs (KURZEPA *et al.*, 2014b).

Figura 3 – Estrutura geral das gelatinases MMP-2 e MMP-9. Apenas a MMP-9 possui a região semelhante ao colágeno do tipo V.



Fonte: Adaptado de KURZEPA *et al.*, 2014.

A atividade das gelatinases, assim como a das outras MMPs, é regulada em vários níveis, sendo através principalmente da transcrição gênica, da ativação das pró-enzimas, e pela ação dos inibidores naturais (KURZEPA *et al.*, 2014a). Devido ao fato de as MMPs serem enzimas proteolíticas, elas são inicialmente secretadas na forma de zimogênios (ou também chamadas de pró-enzimas) no meio extracelular, sendo que o grupo tiol presente no resíduo de pró-peptídeo de cisteína se associa de maneira coordenada ao átomo de zinco do centro ativo, o que impede a ligação desta região a um substrato adequado (KURZEPA *et al.*, 2014a; LARONHA; CALDEIRA, 2020). Pelo fato das gelatinases serem secretadas como zimogênios, ou seja, proenzimas, o grupo tiol do resíduo de cisteína forma uma ligação coordenada com o átomo de zinco presente no sítio catalítico da enzima, o que previne a ligação da enzima ao seu substrato apropriado (KURZEPA *et al.*, 2014b).

O processo de ativação destas enzimas é dividido em duas fases. Na primeira, compostos de baixo peso molecular (como o NO e compostos de mercúrio) são unidos ao grupo tiol do pró-peptídeo, o qual bloqueia o átomo de zinco e rompe a ligação cisteína-zinco mencionada acima, sendo que a inibição do grupo tiol é reversível e o pró-peptídeo ainda não é clivado, levando a apenas uma nova conformação da enzima, também chamado de “*cysteine switch*” (KURZEPA *et al.*, 2014a; KURZEPA *et al.*, 2014b). Já na segunda fase, ocorre a clivagem do pró-peptídeo, o qual é um processo irreversível, levando a uma diminuição no peso molecular das enzimas (o peso molecular da MMP-2 aproxima-se de 66 kDa e da MMP-9 de 86 kDa) (KURZEPA *et al.*, 2014a; KURZEPA *et al.*, 2014b). Esta remoção do pró-peptídeo é dependente de outras endopeptidases, como outras MMPs, furina e plasmina, além de poderem

também ser ativadas através de ERO endógenas (LARONHA; CALDEIRA, 2020; WAN *et al.*, 2008).

As MMPs também têm a sua atividade modulada por íons e reagentes que interagem positivamente na indução da clivagem e ativação destas enzimas, como o zinco, ou também podem interagir de maneira negativa, como os íons cobre que podem diminuir a secreção de MMP-2 (BENJAMIN; KHALIL, 2012). Da mesma forma, as MMPs podem ter suas atividades inibidas por inibidores exógenos ou endógenos, como os inibidores teciduais de MMPs, os TIMPs (BENJAMIN; KHALIL, 2012). Os TIMPs fazem parte de uma família de quatro membros (1, 2, 3 e 4), podendo inibir todas as MMPs, porém com eficácias diferentes (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010). Dentre os membros, o TIMP-2 é o único desta família que interage de maneira específica com a MMP do tipo membrana MT1-MMP e com a gelatinase MMP-2; porém, tanto o TIMP-3 quanto o TIMP-4 também podem interagir com a pró-MMP-2 e o TIMP-1 e TIMP-3 podem interagir com a MMP-9 (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010; BREW; NAGASE, 2010).

Segundo Rodríguez-Sánchez *et al.* (2019), pacientes que apresentam hipertensão arterial crônica ainda que controlada por uso de medicamentos, podem apresentar riscos significativos de desenvolver alterações renais importantes, como glomeruloesclerose, fibrose intersticial e arteriosclerose, presentes na doença renal crônica. As MMPs e seus inibidores teciduais possuem papel fundamental nestas alterações renais, uma vez que agem no remodelamento da matriz extracelular, a qual é o mecanismo crucial para o desenvolvimento da doença renal crônica (RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2019). Neste contexto, estudos têm demonstrado uma relação direta entre níveis elevados de MMP-2 e TIMP-2 no soro de pacientes com doença renal crônica, além de os níveis de MMP-2 estarem diretamente relacionados aos graus de insuficiência renal (KOBUSIAK-PROKOPOWICZ *et al.*, 2018). Outros estudos demonstram que a isoforma MMP-9 possui a capacidade de promover o aparecimento de alterações nas estruturas renais conforme há o desenvolvimento da doença renal crônica, levando a estágios mais avançados da doença com um aumento de fibrose renal, o que demonstra o papel essencial destas enzimas no desenvolvimento de doenças renais (CHENG *et al.*, 2017).

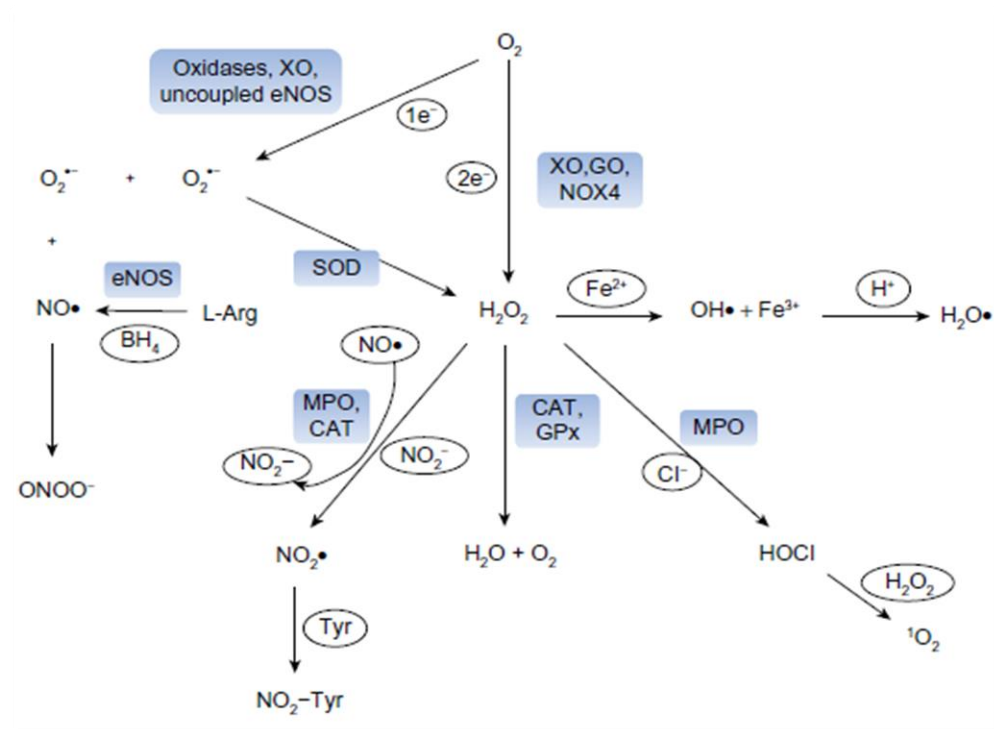
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO NAS ALTERAÇÕES RENAIAS

Um dos mais fundamentais mecanismos para o desenvolvimento da hipertensão arterial é o estresse oxidativo, o qual resulta de um excesso de ERO que não pode ser contrabalanceado por enzimas antioxidantes (GONZÁLES *et al.*, 2014). Em estudos com humanos, foi

demonstrado o desenvolvimento de hipertensão através de um aumento de ERO juntamente com uma diminuição de NO (GONZÁLES *et al.*, 2014).

Dentre as principais ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) existentes, pode-se citar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($OH\cdot$), o oxigênio singlete (1O_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico ($NO\cdot$), o dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$), o peroxinitrito ($ONOO^-$), e o ácido hipocloroso ($HOCl$). O $O_2^{\cdot-}$ é formado através da ação do complexo enzimático NADPH oxidase, sendo considerado o radical livre mais produzido *in vivo*. A produção de maneira excessiva de ERO pela NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase normalmente está relacionada ao desenvolvimento de danos teciduais, associando-se a diversas doenças crônicas, como a doença renal crônica (SUNG *et al.*, 2013). O $O_2^{\cdot-}$ pode ser dismutado a H_2O_2 por uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), e o H_2O_2 também pode ser gerado pelo oxigênio e ação de oxidases vasculares, como a xantina oxidase (XO), glicose oxidase (GO) e NADPH oxidase 4 (NOX4), através da transferência de elétrons ao oxigênio molecular (Figura 4) (PISOSCHI; POP, 2015). O H_2O_2 atua principalmente no ataque na estrutura de heme-proteínas através da liberação de ferro, inativação ou oxidação do DNA, de lipídeos, e de grupos $-SH$ (PISOSCHI; POP, 2015). Esta molécula pode ser eliminada por ação da catalase (CAT) ou da glutathiona peroxidase (GPx), formando água e oxigênio, ou também podem ocorrer reações não enzimáticas para gerar o $OH\cdot$ (RODIÑO-JANEIRO *et al.*, 2013). Uma dessas reações é o ciclo Haber-Weiss, no qual o H_2O_2 reage com ferro intracelular para formar o $OH\cdot$ (SUNG *et al.*, 2013).

Figura 4 – Formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.



Fonte: RODIÑO-JANEIRO *et al.*, 2013.

Legenda: A geração das ERO tem seu início através da redução de O_2 por um elétron levando a formação do $O_2^{\bullet-}$, o qual pode ser dismutado a H_2O_2 por uma reação catalisada pela enzima SOD. O NO^{\bullet} é produzido por óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) a partir de L-arginina e tetra-hidrobiopterina. O NO^{\bullet} formado reage com $O_2^{\bullet-}$ formando $ONOO^-$. O H_2O_2 também pode ser gerado através do oxigênio e da ação de oxidases vasculares, como a XO, GO e NOX4, e pode ser eliminado pela ação da CAT ou GPx, formando água e oxigênio. Além disso, podem ocorrer reações não enzimáticas para gerar o radical OH^{\bullet} a partir do H_2O_2 . As enzimas mieloperoxidasas (MPO) são ativadas pelo H_2O_2 para formar um radical altamente reativo que pode oxidar NO^{\bullet} para NO_2^- e reagir com o NO_2^- para formar o radical $\bullet NO_2$. O H_2O_2 também pode ser usado pela MPO para formar o HOCl. O radical 1O_2 é formado a partir da reação de HOCl com H_2O_2 . (ERO: Espécies reativas de oxigênio. O_2 : Oxigênio. $O_2^{\bullet-}$: Ânion superóxido. H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio. SOD: Superóxido dismutase. NO^{\bullet} : Óxido nítrico. $ONOO^-$: Peroxinitrito. XO: Xantina oxidase. GO: Glicose oxidase. NOX4: NADPH oxidase 4. CAT: Catalase. GPx: Glutathiona Peroxidase. OH^{\bullet} : Radical hidroxila. $\bullet NO_2$: Dióxido de nitrogênio. HOCl: Ácido hipocloroso. 1O_2 : Oxigênio singlete).

As enzimas MPO são ativadas por H_2O_2 e promovem a oxidação de NO^{\bullet} para ânion dióxido de azoto (NO_2^-), o qual pode reagir com o NO_2^- para formar o radical $\bullet NO_2$. Além disso, o H_2O_2 pode ser usado pela MPO para formar o HOCl, o qual é um composto bastante reativo por agir oxidando moléculas importantes como lipídeos, proteoglicanos, aminoácidos e outros constituintes da membrana celular (SUNG *et al.*, 2013). O NO^{\bullet} é produzido por eNOS a partir de L-arginina, e tetra-hidrobiopterina. O radical $O_2^{\bullet-}$ e o radical NO^{\bullet} reagem formando NOO^- , o qual é um radical potente que quando está protonado, leva a depleção de grupos sulfidríla, podendo também causar danos a várias moléculas, agindo de maneira semelhante ao radical OH^{\bullet} (PISOSCHI; POP, 2015; RODIÑO-JANEIRO *et al.*, 2013).

As enzimas da família das SOD podem transformar $O_2^{\bullet-}$ através da depleção destes radicais após a ação de fatores extracelulares, como radiação ionizante e prejuízos oxidativos,

ou também diretamente da cadeia de transporte de elétrons no metabolismo do oxigênio (PISOSCHI; POP, 2015). Estas enzimas são as principais quanto à remoção de $O_2^{\bullet-}$, e possuem 3 isoformas principais nos mamíferos: a citoplasmática CuZnSOD (SOD-1), a mitocondrial MnSOD (SOD-2), e a extracelular CuZnSOD (SOD-3) (FUJITA *et al.*, 2009). Cada isoforma da SOD provém de genes distintos, porém as 3 isoformas apresentam a mesma função: produzir H_2O_2 a partir de $O_2^{\bullet-}$ (FUJITA *et al.*, 2009).

A GPx é uma enzima citosólica que depende de selênio para exercer sua atividade, atuando na redução da molécula de H_2O_2 a água e oxigênio, e em contrapartida oxida glutatona reduzida (GSH) a glutatona dissulfeto (GSSG), além de reduzir radicais peróxido a álcoois e oxigênio (FANUCCHI, 2014; TABET; TOUYZ, 2007). O sistema da GPx está quase sempre localizado onde se encontra a SOD (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; HALLIWELL, 1994). Na ausência de atividade adequada de GPx ou de níveis de GSH, H_2O_2 e peróxidos lipídicos não são detoxificados e podem ser convertidos a OH^{\bullet} , o qual é extremamente reativo, além de poder também gerar radicais de lipoperoxidação por meio de metais de transição como o ferro (Fe^{2+}) (TABET; TOUYZ, 2007). Este sistema que envolve GPx e GSH é considerado como a principal defesa em níveis baixos de estresse oxidativo (TABET; TOUYZ, 2007).

A CAT é uma enzima que contém o grupo heme em seu sítio catalítico, se encontrando presente nos peroxissomas das células dos mamíferos, tendo como provável função a destruição do peróxido de hidrogênio gerado pelas enzimas oxidativas localizadas dentro das organelas subcelulares (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010). De maneira mais específica, em condições normais esta enzima leva à dismutação de H_2O_2 a oxigênio molecular e duas moléculas de água ($2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$) (BAUREDOR; HEDERSTEDT, 2013). A CAT tem grande capacidade de destruir o H_2O_2 em termos de moléculas de H_2O_2 destruídas por minuto por molécula de enzima, sendo que ela é uma das enzimas mais ativas conhecidas. Porém, sua afinidade pelo H_2O_2 é baixa, sendo necessárias altas concentrações de H_2O_2 para que ela possa trabalhar rapidamente. Em contrapartida, a CAT transforma o H_2O_2 lentamente quando existem pequenas concentrações do mesmo (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010). Em conjunto, essas três enzimas funcionam para metabolizar o H_2O_2 e outros peróxidos derivados da oxidação de macromoléculas.

Em estudos feitos com modelo animal de nefrectomia para o desenvolvimento de doença renal crônica, verificou-se que houve uma redução na expressão das enzimas CAT e GPx, o que demonstra que a doença leva a uma supressão do sistema enzimático antioxidante do organismo (ARAUJO; WELCH, 2006). Além disso, a inibição de NO por inibidores endógenos pode levar ao desenvolvimento de estresse oxidativo e doença renal, demonstrando

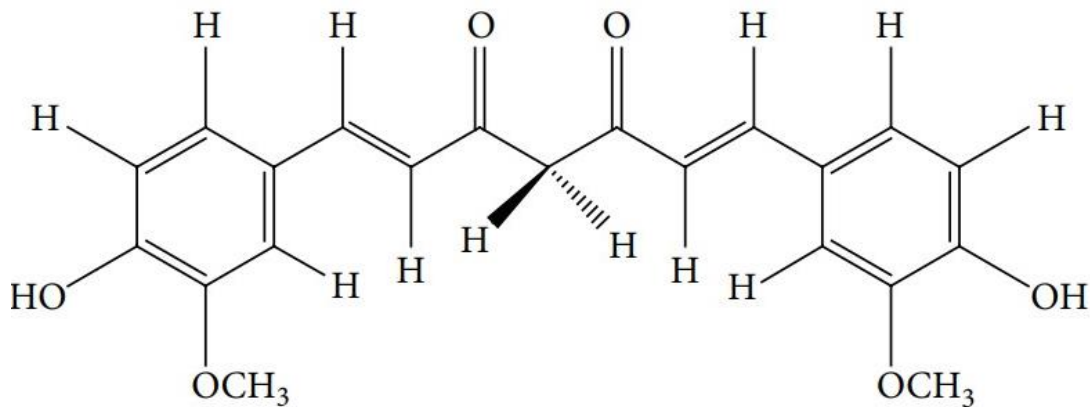
que o NO tem papel fundamental na preservação renal (ARAUJO; WELCH, 2006). Em um estudo feito com indução à hipertensão através da utilização de L-NAME em ratos, demonstrou-se que houve uma diminuição na atividade das enzimas SOD e GPx nos tecidos renais, e um aumento na atividade da enzima CAT devido ao aumento de H₂O₂ (OKTEM *et al.*, 2011). Em um outro estudo feito também com a técnica de indução à hipertensão por L-NAME e ratos, verificou-se que houve um aumento significativo na atividade da enzima CAT e nos níveis de peroxidação lipídica nos tecidos renais, demonstrando um aumento significativo de estresse oxidativo (TALAS *et al.*, 2014).

2.6 O USO DA CURCUMINA PODE LEVAR A UMA REDUÇÃO DOS DANOS RENAIIS

A curcumina (*Curcuma longa*), é pigmento amarelo natural proveniente dos rizomas de *Curcuma Longa L.* (açafão), correspondendo a cerca de 4% de sua composição química, sendo amplamente utilizada em todo mundo, sobretudo enquanto tempero asiático e como tratamento na medicina chinesa (ALI *et al.*, 2006; TAPIA *et al.*, 2013). Esta substância desde muitos séculos é utilizada para o tratamento de inúmeras doenças, como o reumatismo, úlceras provenientes do diabetes, tosse, anorexia e sinusite (ALI *et al.*, 2006). Além disso, a curcumina possui inúmeras ações terapêuticas comprovadas, como anti-inflamatória, antioxidante, anti-carcinogênica, anti-mutagênica, dentre outras (ALI *et al.*, 2018).

A curcumina (C₂₁H₂₀O₆) é uma molécula cujo nome IUPAC é (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, e que possui peso molecular de 368,38 g/mol (Figura 5) (TEIXEIRA *et al.*, 2022). Essa molécula apresenta uma meia-vida de 6-7 horas e, devido a sua composição ser bastante lipofílica, sua solubilidade em água é baixa, o que pode promover uma baixa biodisponibilidade e eficácia (JÄGER *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2022). Por isso, a via de administração é crucial, assim como o veículo utilizado para que seu metabolismo e ação possam ser mais eficazes (TEIXEIRA *et al.*, 2022). Além disso, segundo Moghadamtousi e colaboradores (2014), a curcumina apresenta seguras atividades farmacológicas tanto em animais como em humanos, ainda que utilizada em altas doses em ensaios clínicos com humanos (12 g/dia) (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014; VAREED *et al.*, 2008).

Figura 5 – Estrutura química da curcumina.



Fonte: MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014.

A curcumina é considerada um antioxidante bifuncional, possuindo a capacidade de exercer tanto efeito direto, através de atuar retirando as ERO; como também indireto, através de induzir a expressão de proteínas citoprotetivas, como a glutathione transferase, a heme oxigenase 1, a catalase, e a ferritina (TAPIA *et al.*, 2013). Segundo Jakubczyk *et al.* (2020), as propriedades antioxidantes da curcumina podem ser determinadas e visualizadas pela redução da concentração de malonaldeído (MDA) no soro, o qual é um marcador da peroxidação lipídica, e também pelo aumento da atividade das enzimas SOD e GPx, uma vez que os altos níveis de MDA estão relacionados com o excesso de radicais livres. Já no estudo feito por Wilken e colaboradores (2011), verificou-se que a curcumina teve a capacidade de prevenir a formação de peroxinitrito por macrófagos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* por meio da inibição da atividade das iNOS.

Segundo Tapia *et al.* (2012), em um estudo feito com modelo animal de inflamação induzida por 5/6NX em ratos, ao se administrar curcumina antes e durante o procedimento experimental, verificou-se que esta impediu o desenvolvimento de efeitos danosos aos rins, além de proteger contra o estresse oxidativo, e diminuir a hipertensão e hiperfiltração glomerular. Em um outro estudo promovido por Wu e colaboradores (2017), verificou-se que em um modelo de insuficiência renal aguda induzido por glicerol, a curcumina exerceu efeitos protetivos nos rins através da inibição de estresse oxidativo e também por diminuir os danos renais e a apoptose celular. Além disso, no estudo de Damiano *et al.* (2020), demonstrou-se que utilizando um modelo de nefrotoxicidade induzido pela micotoxina ocratoxina A, a administração de curcumina promoveu uma diminuição no estresse oxidativo e preveniu a hiperfiltração glomerular, além de reduzir os danos glomerulares e tubulares, assim como a

inflamação e a fibrose tubulointersticial, demonstrando a capacidade renoprotetora da curcumina.

3 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos do uso de curcumina na pressão arterial no modelo experimental por inibição de óxido nítrico em ratos e avaliar os efeitos deste componente nos níveis das MMPs e estresse oxidativo nos rins associados a esse modelo de hipertensão.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do L-NAME e da curcumina em um período de 14 dias sobre:

- a) A pressão arterial sistólica em animais controles e hipertensos após administração de L-NAME;
- b) A função e remodelamento renal;
- c) A formação de ERO e a atuação de antioxidantes endógenos nos rins;
- d) Os níveis das MMPs- 2 e 9 e do inibidor TIMP-2 nos rins;
- e) Os níveis de ED1 e MPO nos rins.

4 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a hipertensão causa alterações renais e que essas alterações têm sido associadas ao aumento de ERO. Essas espécies, por sua vez, podem ativar MMPs e ambos participam ativamente do processo de remodelamento do tecido renal. Como a curcumina possui conhecida atividade antioxidante, acreditamos que o tratamento de animais hipertensos com essa substância possa proteger os rins das alterações causadas pela hipertensão arterial.

Com base nas informações acima e nos resultados apresentados, a hipótese deste projeto é que hipertensão através da inibição de NO leve ao desenvolvimento de alterações renais importantes que contribuirão para o desenvolvimento de disfunção renal. Acreditamos que a ativação das metaloproteinases e o estresse oxidativo façam parte dos mecanismos envolvidos nessas alterações renais, e que o tratamento com a curcumina possa reverter ou, ao menos, diminuir estas ações sobre as lesões renais promovidas pela hipertensão.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos machos *Wistar*, com peso de 180 a 200g, fornecidos pelo Anilab (Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda- Laboratórios Veterinários, Paulínia-SP) e mantidos no Laboratório Experimental Animal da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Os animais foram mantidos em salas com ciclos claro/escuro de 12 horas, com temperatura

controlada (22-25 °C), em caixas de polietileno e receberam água e ração comercial *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética animal da UNAERP (nº 13/2017) (Anexo A).

5.2 INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO PELA TÉCNICA L-NAME

Para induzir a hipertensão, foi utilizado o modelo experimental por bloqueio de formação de NO, utilizando o composto L-NAME. Os animais foram tratados com L-NAME por gavagem diariamente pela manhã dose de 20 mg/kg/dia por 14 dias, e os animais controle foram tratados com água destilada também por gavagem no mesmo período. Os animais que apresentaram aumento de 30 mmHg na pressão arterial foram considerados hipertensos (MAHMOUD *et al.*, 2015). Ao mesmo tempo, os animais foram tratados por gavagem no período da tarde com curcumina diluída em carboximetilcelulose nas doses de 50mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia de acordo com o menor efeito tóxico já descrito na literatura (KUKONGVIRIYAPAN *et al.*, 2014; NAKMAREONG *et al.*, 2011). Assim, foram realizados cinco grupos experimentais contendo de 8 a 10 animais em cada grupo (alguns animais morreram durante o procedimento), conforme descrito abaixo:

CONTROLE + VEÍCULO (CV): animais tratados com veículo.

L-NAME + VEÍCULO (LV): animais que receberam L-NAME e veículo.

CONTROLE + CURCUMINA 100 (CC): animais tratados com curcumina na dose de 100 mg/kg/dia.

L-NAME + CURCUMINA 50 (LC50): animais que receberam L-NAME e curcumina na dose de 50 mg/kg/dia.

L-NAME + CURCUMINA 100 (LC100): animais que receberam L-NAME e curcumina na dose de 100 mg/kg/dia.

Ao final do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com uretano 1,25 g/kg e o sangue colhido por punção da veia cava foi distribuído em tubos apropriados para coleta de sangue. O plasma foi coletado em heparina e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, e tanto plasma quanto soro foram armazenados a -20°C e utilizados para os ensaios de determinação dos níveis de ureia e creatinina (soro), assim como para a determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (plasma). Os rins foram coletados de duas formas: para análises bioquímicas, congelamos os rins esquerdos inteiros a -80°; para análises histológicas, fixamos os rins direitos (após serem cortados em 3 partes: polo superior, polo inferior e parte mediana) em paraformaldeído 4%.

A pressão arterial foi avaliada diariamente pelo método não invasivo da pletismografia de cauda usando o Pletismógrafo EFF306 (Insight, Brasil). Brevemente, os animais foram alocados em tubos de contenção e o manguito e um transdutor foram colocados na cauda do animal. O transdutor estava acoplado a um computador para as medidas de pressão. Foram realizadas 10 medidas consecutivas, sendo as 3 primeiras descartadas. As medidas foram analisadas e as médias utilizadas para estatística. Além disso, determinou-se o peso corporal dos animais durante todo o protocolo experimental.

5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

Em todos os ensaios descritos a seguir (com exceção da ureia, creatinina e histologia renal) foi realizada a normalização pela concentração de proteína de cada amostra. O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Bronsted-Lowry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

5.4 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

As concentrações de ureia e creatinina foram determinadas no soro. Para a determinação de ureia, utilizou-se o kit InterKit Ureia UV (#1728, Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil), em que se adicionou 1,0mL do reagente de trabalho previamente preparado a 0,01mL de amostra ou padrão, e utilizando-se uma cubeta termostatizada a 37°C, verificou-se as absorbâncias em espectrofotômetro a 340nm após 30 segundos e 60 segundos. Os cálculos foram feitos a partir da média dos valores encontrados para cada amostra e para o padrão e expressos em mg/dL.

Para a determinação de creatinina, utilizou-se o kit InterKit Creatinina (#1753, Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil), em que se adicionou 1,0mL do reagente de trabalho previamente preparado a 0,1mL de amostra ou padrão, e utilizando-se uma cubeta termostatizada a 37°C, verificou-se as absorbâncias em espectrofotômetro a 510nm após 30 segundos e 90 segundos. Os cálculos foram feitos a partir da média dos valores encontrados para cada amostra e para o padrão e expressos em mg/dL.

5.5 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica foi avaliada através da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), estimada como dialdeído malônico, também conhecido como malonaldeído, por fluorimetria. Para esta determinação, foram-se feitas duas análises: uma no plasma e uma no tecido. Para a primeira, colocou-se em tubos de ensaio a mistura da reação contendo 100 μL de água destilada, 50 μL de duodecil sulfato de sódio (SDS, 8,1%), 100 μL de água destilada, 100 μL plasma, 375 μL de ácido acético (20%) e 375 μL de TBA (0,8%), a qual foi incubada em banho-maria a 95°C por 1 hora. Posteriormente, a mistura foi centrifugada (4000 rpm por 10 min) e o sobrenadante foi recolhido e colocado em placas para leitura no espectrofotômetro (532 nm). A curva padrão foi feita de maneira similar, contendo 25 μL de concentrações conhecidas de MDA. A concentração de TBARS no plasma foi calculada de acordo com a curva padrão e expressa em nmol/L. Já para a segunda análise, para cada 150 μL de amostra ou de padrão, foram adicionados 750 μL de ácido fosfórico 1,22 M, 1,350 ml de água e 750 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% em ácido acético 50%. Após homogeneização por 30 segundos, as amostras foram incubadas em banho-maria a 95°C, durante 60 minutos. Em seguida, as mesmas foram resfriadas em banho de gelo. Por fim, foram adicionados 1,8 ml de metanol e 0,2 ml de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M para cada alíquota de 1,0 ml de amostra ou de padrão. As leituras foram realizadas em espectrofluorímetro Varian, Cary eclipse, ($\lambda_{\text{excitação}}$: 532 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$: 553 nm) e a concentração de malonaldeído foi estimada utilizando uma curva padrão com tetraetoxipropano e expressa em nmol/mg proteína.

5.6 DETERMINAÇÃO DE H_2O_2

As amostras de tecido foram homogeneizadas em 300 μL de solução de Krebs de pH 7,4, com a seguinte composição (mM): NaCl 130; KH_2PO_4 1,18, KCl 4,7; MgSO_4 1,17; NaHCO_3 14,9; glicose 5,5; CaCl_2 1,6. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 5 minutos a 4°C. Determinou-se a concentração de H_2O_2 por fluorimetria utilizando o kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase assay kit (#A22188, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), como descrito anteriormente pela literatura (SIMPLÍCIO *et al.*, 2015). Os resultados foram representados como nmol H_2O_2 /mg proteína.

5.7 DETECÇÃO DE $\text{O}_2^{\cdot-}$

Para se determinar os níveis de $\text{O}_2^{\cdot-}$, utilizou-se a sonda lucigenina para se realizar a técnica de luminescência, em que se verifica a atividade da enzima NAD(P)H oxidase. Para

isto, amostras de tecido renal previamente cortados foram homogeneizados com 200 μ L de tampão PBS (pH 7,4) e foram transferidos para frascos de luminescência contendo 1 ml de tampão krebs-HEPES, pH 7,2 e 5 μ mol/l de lucigenina. Após avaliação dos valores da linha de base, o substrato enzimático β -NAD(P)H (100 μ mmol/L) foi adicionado à solução e as contagens de luminescência foram medidas continuamente durante 15 minutos em luminômetro marca Berthold 9505 (EG&G Instruments GmbH, Munich, Germany) a 37 °C. Os valores da linha de base obtidos na ausência de β -NAD(P)H foram descontados dos valores obtidos na presença de β -NAD(P)H. Os resultados foram expressos em unidades relativas de luminescência (URL)/mg/minuto, como descrito previamente (JANISZEWSKI *et al.*, 2002).

5.8 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

5.8.1 Determinação da atividade tecidual da SOD

As amostras de tecido coletadas e congeladas foram homogeneizadas com PBS pH 7,4 e levadas à centrífuga a 1500 g por 12 minutos a 4°C. Em seguida, foi adicionado 20 μ L de sobrenadante a uma placa de Elisa de 96 poços para reagir com a solução de trabalho de tetrazólio. Quanto menor a atividade da SOD na reação, maior a concentração de O_2^- na amostra, o qual reage com o tetrazólio, levando a formação de um composto chamado formazan, que possui coloração amarela. Os resultados foram expressos em % da taxa de inibição, ou seja, determina a capacidade da SOD em inibir a reação do O_2^- com o tetrazólio (SIMPLICIO *et al.*, 2015).

5.8.2 Determinação da atividade tecidual da CAT

As amostras de tecido coletadas e congeladas foram homogeneizadas com PBS pH 7,4 e levadas à centrífuga a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Determinou-se o volume de amostra (de acordo com a resposta ao peróxido de hidrogênio), e utilizando-se uma cubeta de quartzo, adicionou-se 1 mL de PBS 10X previamente preparado e o volume de amostra definido, zerando-se o aparelho a 250 nm. Logo em seguida, adicionou-se 100 μ L de peróxido de hidrogênio 100mM e monitorou-se a absorbância por 1 minuto, anotando os valores de 30 segundos e 60 segundos. Os cálculos foram feitos a partir da subtração das absorbâncias encontradas (AEBI, 1984) e expressos como U/mg proteína, sendo que 1 U corresponde à atividade da enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de peróxido de hidrogênio por minuto.

5.8.3 Determinação dos níveis teciduais da GSH

As amostras de tecido coletadas e congeladas foram homogeneizadas com PBS pH 7,4 e levadas à centrífuga a 4000 rpm por 12 minutos a 4°C. Em seguida, 100 µL do homogenato foi adicionado a 100 µL de ácido tricloroacético (12,5%), permanecendo no gelo por 30 minutos e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Para montar a placa de Elisa de 96 poços, adicionou-se 30 µL da amostra, 270 µL de Tris HCl e 5 µL de Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB; 3,96 mg de DTNB em 1 mL de metanol). Quando o ácido entra em contato com o grupo SH – tiol dos grupos sulfidrílicos, produz então uma coloração amarela, a qual é lida por espectrofotômetro a 415 nm. Os valores foram expressos em µg GSH/mg de proteína. (SIMPLICIO *et al.*, 2015).

5.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade de MPO foi determinada como uma estimativa de acumulação de neutrófilos no tecido renal. Para isso, pesou-se 50 g de cada amostra de tecido renal e adicionou-se 500 µl de solução tampão 1 (5,84 g/L de NaCl 0,1M, 5,53 g/L de Na₂EDTA 0,015M, 200 mL de tampão NaPO₄, 1,168 g de NaCl; ajustando o pH para 4,7 e adicionando mais 1,116 g de Na₂EDTA), homogeneizando em polytron e centrifugando por 10 minutos a 4°C em 10.000 rpm. Adicionou-se sobre o precipitado 750 µl de NaCl 0,2% e homogeneizou-se por 30 segundos. Adicionou-se então 750 µl de NaCl 1,6% com glicose 5%, homogeneizando. Centrifugou-se por 10 minutos a 4°C em 10.000 rpm, desprezando o sobrenadante. Sobre o precipitado adicionou-se 250 µl de tampão 2 (200 mL de Na₃PO₄ 0,0M, ajustando para pH 5,4 e adicionando em seguida H-TAB 0,5% - 0,5 g em 100mL), homogeneizando. Congelou-se e descongelou-e a amostra 3x no nitrogênio líquido, centrifugou-se a 15 minutos a 4°C em 10.000 rpm e o sobrenadante foi usado para o ensaio. Na placa, adicionou-se 25 µl de amostra em duplicata além do branco (25 µl de tampão 2); e sobre todas as amostras colocou-se 25 µl de substrato TMB. Incubou-se a 37 °C por 5 minutos, e depois adicionou-se 25 µl de H₂O₂ 0,002%, incubando novamente a 37 °C por 5 minutos. Por fim, adicionou-se 100 µl de H₂SO₄ 4M, e leu-se no espectrofotômetro na absorvância de 450 nm.

5.10 WESTERN BLOTTING

Para a preparação das amostras, os tecidos congelados foram homogeneizados em tampão de lise RIPA (1 mL de PBS 10X, 0,1 mL de IGEPAL, 0,05 g de deoxicolato de sódio, 0,1 mL de SDS 10%, água destilada qsp para 10 mL; após 4 µL de PMSF e 5 µL de inibidor de protease) centrifugados a 10000 g por 10 min a 4°C. Foi realizado imunoblot no homogenato total. As amostras homogeneizadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida de 10% ou 12% SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas overnight, 4°C, com anticorpo primário para MMP-2 (#MAB3308, EMD Millipore Corporation), MMP-9 (#AB19016, EMD Millipore Corporation), TIMP-2 (#MAB3310, EMD Millipore Corporation), ED1 (#MCA341GA, *mouse anti rat* CD68, Bio-Rad Laboratories, Inc) (marcação de macrófagos) e SOD-1 (#SC-8637). Em seguida foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado (#NA931, anti-mouse IgG, GE Healthcare, para MMP-2 e TIMP-2; #NA934, anti-rabbit IgG, GE Healthcare, para MMP-9; #NA931, anti-mouse IgG, GE Healthcare, para ED1; e anti-goat IgG, para SOD-1), conjugado a peroxidase, por 90 minutos, à temperatura ambiente. As bandas foram reveladas com ELC (GE Healthcare) e as imagens foram detectadas (ImageQuant LAS 500, GE Healthcare) e digitalizadas (IQuantCapture 400, v.1.0.0, GE Healthcare). As intensidades das bandas foram comparadas através do programa ImageQuant (GE Healthcare) e expressas em unidades arbitrárias. Utilizou-se a proteína β-actina (#A3854, monoclonal anti-β, Sigma) (controle interno; 1:12500) como fator normalizador.

5.11 ZIMOGRAFIA

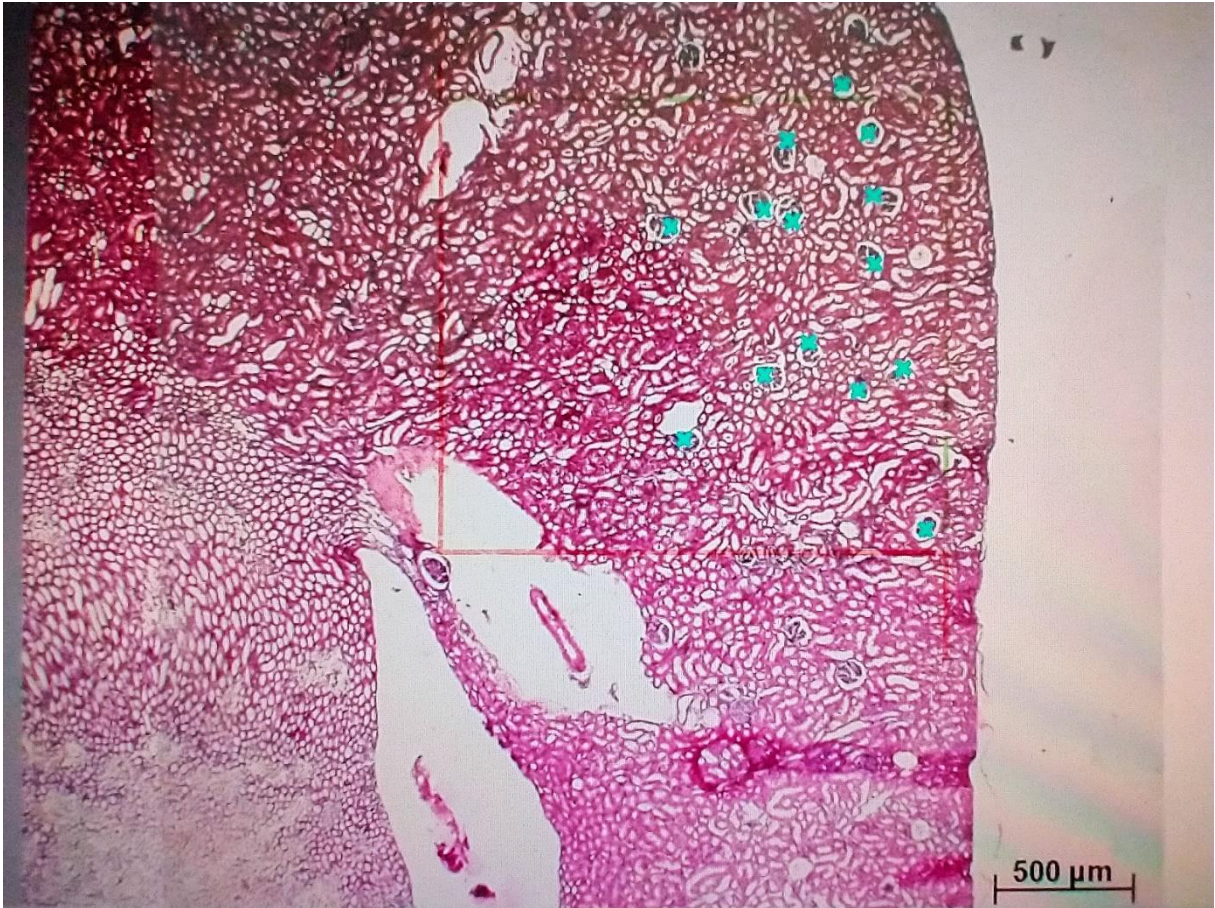
A quantidade de MMP-2 nos tecidos renais, foi determinada por meio da técnica de zimografia (CASTRO *et al.*, 2008; CERON *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2008). Trata-se de uma técnica em que um gel de eletroforese é copolimerizado ao substrato para as enzimas em estudo. O substrato utilizado foi a gelatina, devido ao fato das MMP-2 serem gelatinases. As amostras de rim foram trituradas e homogeneizadas em tampão de extração (tampão CaCl₂ 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; contendo os inibidores de proteases NaF 50 mM, Ortov 50 mM, fenantrolina 20 mM; seguindo a seguinte proporção: 20 µL NaF, 10 µL Ortov, 50 µL fenantrolina para 920 µL de tampão) e incubadas por 16 horas em geladeira. Centrifugou-se a 4 °C a 3000 rpm por 15 minutos e retirou-se o sobrenadante. Deste sobrenadante, quantificou-se proteína por meio do método de Bradford descrito anteriormente, e calculou-se um volume correspondente a 15 µg de proteína para cada amostra. Em seguida, transferiu-se a quantidade de cada amostra correspondente a 15 µg de proteína para tubos de 0,5 mL e adicionou-se a cada

um deles tampão de amostra não redutor 6X na proporção de 1:5 de amostra, e congelou-se as amostras preparadas em -20°C . Para preparar os géis, fez-se inicialmente o gel de separação 10% (7,308 mL água destilada; 3,75 mL da solução 40% acrilamida/bisacrilamida; 3,75 mL de tampão Tris Cl/SDS 4X pH 8,8; 0,188 de gelatina; 50 μL de APS; 10 μL de TEMED), e após endurecer, aplicou-se em cima o gel de largada 3,9% (3,212 de água destilada; 0,488 da solução 40% acrilamida/bisacrilamida; 1,25 mL de tampão Tris Cl/SDS 4X pH 6,8; 25 μL de APS; 5 μL de TEMED), inserindo junto a estes géis os pentes para a formação de poços. Antes de aplicar as amostras no gel, colocou-as em banho-maria por 15 minutos a 37°C , aplicando-as em seguida. O padrão utilizado na corrida foi soro fetal bovino. Após eletroforese, estes géis foram submetidos a 2 banhos de 30 minutos de Triton a 2%, para remover o SDS e foram colocados em solução Tris-HCl 50 mM para a renaturação das proteínas e ativação enzimática, por 16 horas. Posteriormente, foram fixados e corados com solução *Coommassie Blue* 0,05% por 1,5 horas, levando a uma coloração completa do gel. Para a visualização das bandas correspondentes às MMPs em estudo, utilizou-se descorante feito de metanol a 30% e ácido acético a 10%, trocando o descorante em três tempos: 15 minutos, 30 minutos, e 60 minutos. Observou-se a degradação da gelatina incorporada ao gel por meio da formação de bandas claras contra o fundo azul do corante. A quantificação das bandas das MMPs foi feita usando o programa de imagens ImageJ. A MMP-2 foi identificada por meio dos pesos moleculares: 75, 72, e 64 kDa.

5.12 AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA RENAL

Os rins do lado direito dos animais foram cortados em 3 partes: polo superior, polo inferior e parte mediana, foram fixados em paraformaldeído 4% e inseridos em parafina. Esses tecidos foram cortados (5-7 μm) e corados em hematoxilina e eosina (HE) com objetivo de verificar suas estruturas teciduais, principalmente a extensão da lesão glomerular. As lâminas foram fotografadas utilizando microscopia convencional, e analisou-se cada animal de cada grupo por meio da contagem de glomérulos por foto em um quadrante fixo (utilizando-se o aumento de 5x), sendo que para cada animal foram feitas cerca de 45 fotos (considerando os polos superior e inferior e a região mediana do rim). A contagem foi feita por meio do programa *AxioVision* (versão 4.8.2), como mostrado abaixo:

Figura 6 – Contagem de glomérulos por campo.



Fonte: Da Autora.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no nosso estudo foram analisados com o programa *GraphPad Prism 8* e foram analisados com ANOVA (análise de variância) de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey*, ANOVA de duas vias seguidas pelo pós-teste de *Tukey*; e também por meio do Teste T de *Student*. Foram considerados estatisticamente diferentes valores com $p < 0,05$.

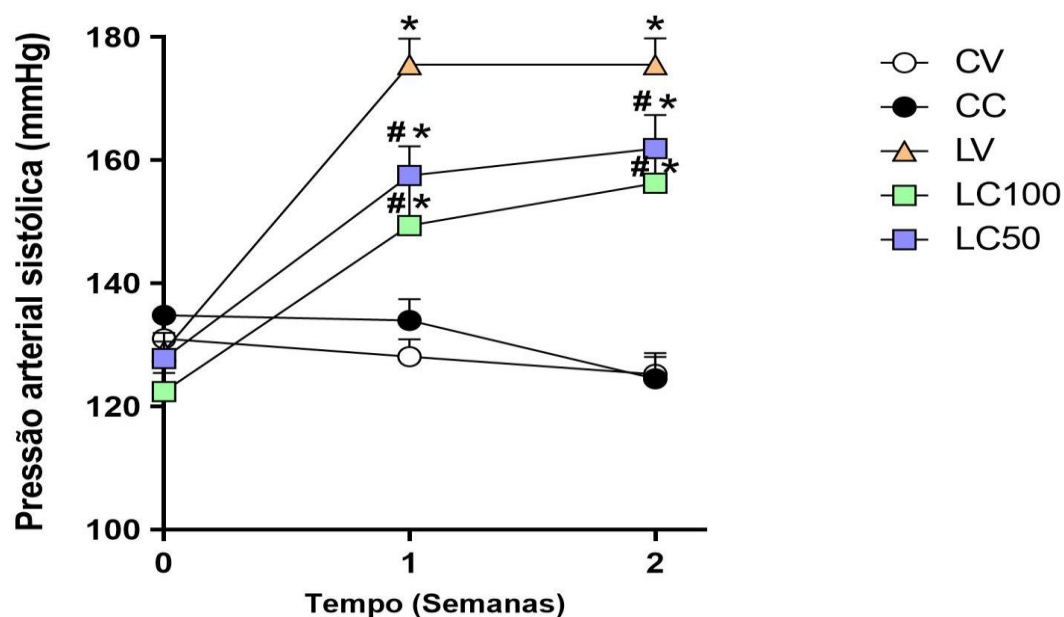
6 RESULTADOS

6.1 PRESSÃO ARTERIAL

A Figura 7 apresenta os valores de pressão arterial (mmHg) correspondentes aos cinco grupos em estudo, durante 2 semanas. Percebe-se que os valores basais de pressão arterial

sistólica foram similares nos cinco grupos experimentais antes do início do tratamento. Entretanto, logo na primeira semana após o início do tratamento com L-NAME, a pressão sistólica aumentou no grupo LV quando comparado ao grupo CV ($p < 0,05$). Quanto aos animais hipertensos que receberam tratamento com curcumina, ambos os grupos (LC100 e LC50) apresentaram queda da pressão arterial em relação ao grupo de animais hipertensos (LV) logo na primeira semana de tratamento ($p < 0,05$). O tratamento com curcumina não alterou a pressão dos animais controles ($p > 0,05$).

Figura 7 – Pressão arterial (mmHg) dos animais.



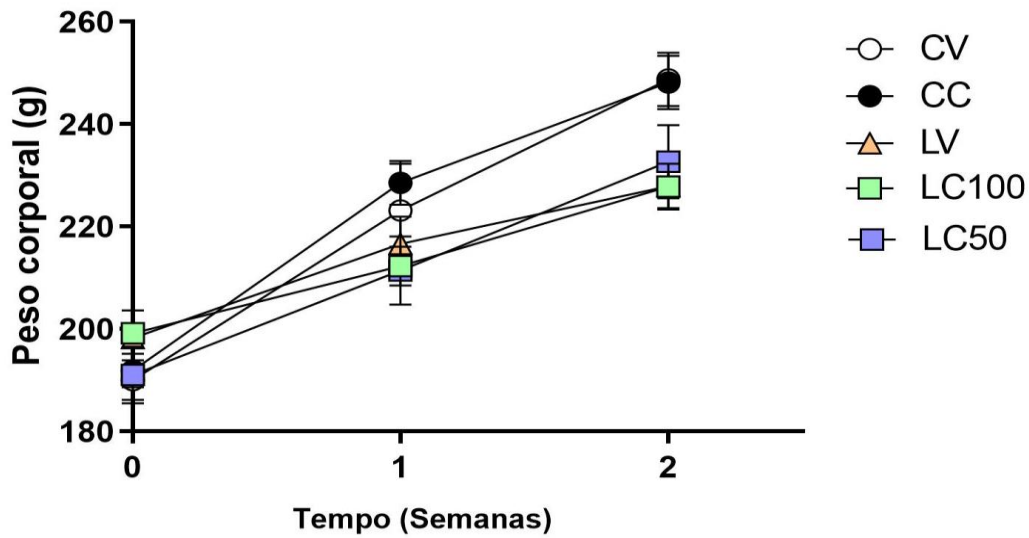
Fonte: Da Autora.

Legenda: Número de animais: $n=7-8$ por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *one-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. * $p < 0,05$ versus CV; # $p < 0,05$ versus LV. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.2 PESO CORPORAL

A Figura 8 apresenta os valores de peso corporal dos animais determinados semanalmente pelo período de duas semanas. É possível perceber que não houve alterações estatisticamente significativas entre os cinco grupos experimentais ($p > 0,05$) durante o período de estudo, conforme representado a seguir.

Figura 8 – Peso corporal (g) dos animais.



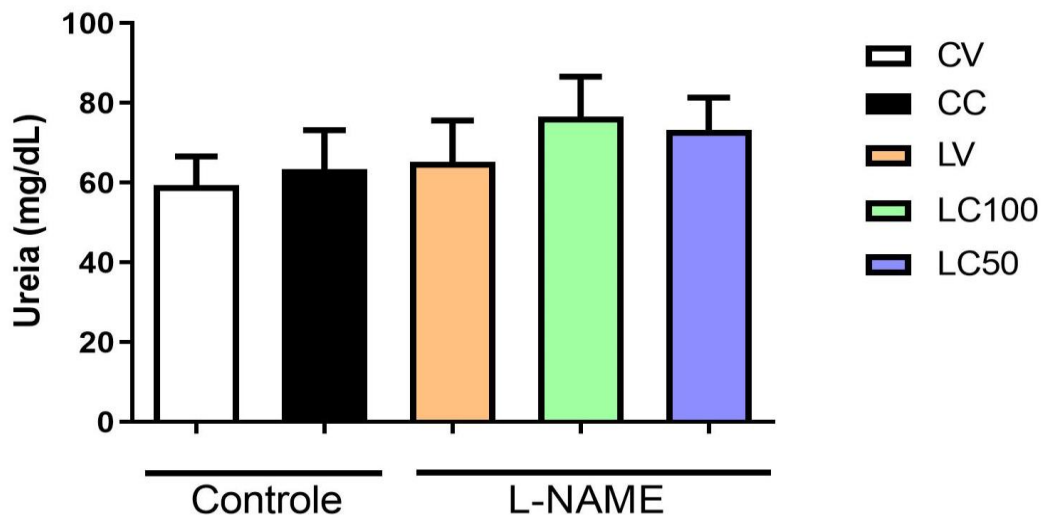
Fonte: Da Autora.

Legenda: Ratos *Wistar* em tratamento durante um período de 14 dias. Número de animais: n=7-8 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *one-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. $p > 0,05$. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.3 UREIA

Conforme observado na Figura 9, percebe-se que não houve alterações estatisticamente significativas entre os cinco grupos experimentais nos níveis de ureia no soro ($p > 0,05$).

Figura 9 – Ureia em soro (mg/dL).



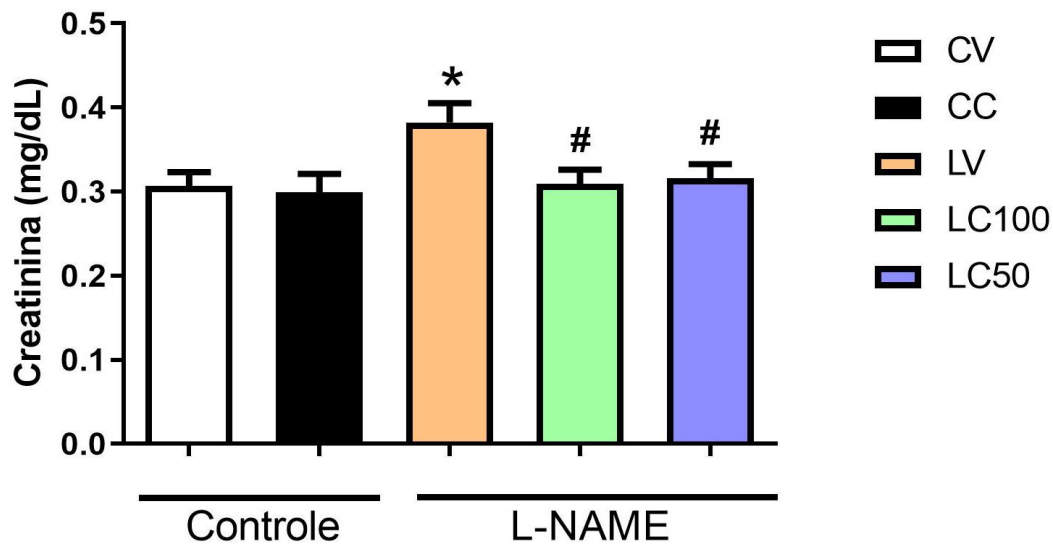
Fonte: Da Autora.

Legenda: Animais em tratamento durante um período de 14 dias. Número de animais: n=16 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. $p > 0,05$. Teste T Student. $p > 0,05$. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.4 CREATININA

A Figura 10 apresenta os valores de creatinina em soro (mg/dL) correspondentes a cada grupo experimental. A indução da hipertensão promoveu um aumento significativo no grupo sem tratamento quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$), e o tratamento com curcumina levou a uma diminuição estatisticamente significativa tanto no grupo LC100 quanto no grupo LC50 ao serem comparados com o grupo hipertenso LV ($p < 0,05$).

Figura 10 – Creatinina em soro (mg/dL).



Fonte: Da Autora.

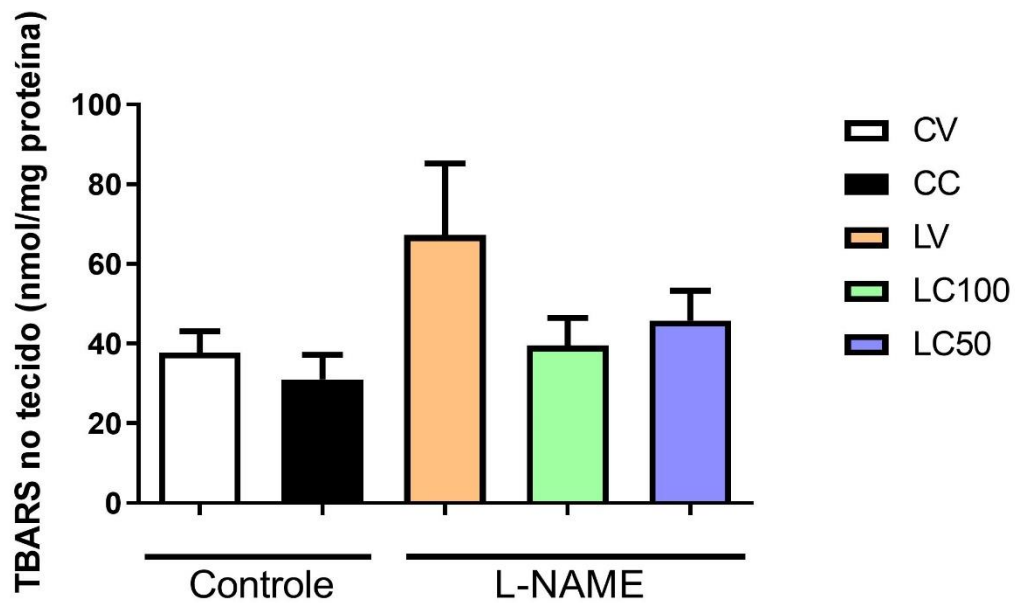
Legenda: Animais em tratamento durante um período de 14 dias. Número de animais: n=16 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. * $p < 0,05$ versus CV; # $p < 0,05$ versus LV. Teste T Student. # $p < 0,05$ versus LV. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.5 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

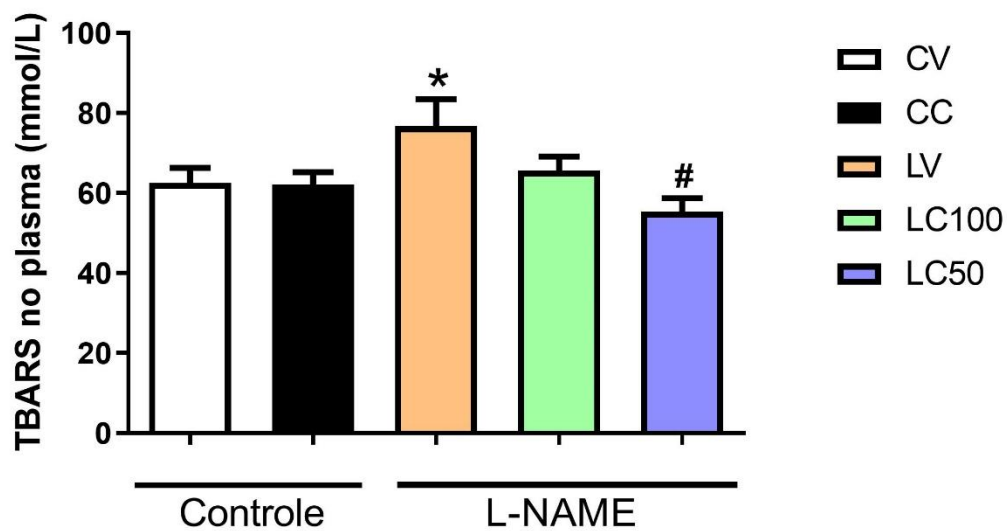
A Figura 11 apresenta os resultados obtidos através da determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido e no plasma. Percebe-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os cinco grupos em estudo ($p > 0,05$) para o TBARS no tecido. Porém, é possível perceber que a indução da hipertensão promoveu um aumento significativo na peroxidação lipídica no plasma no grupo LV quando comparado ao grupo CV ($p < 0,05$), e o tratamento com curcumina levou a uma diminuição estatisticamente significativa no grupo LC50 ao comparar com o grupo hipertenso LV ($p < 0,05$).

Figura 11 – Efeito do uso da curcumina sobre a produção de TBARS em tecido renal (nmol/mg proteína) e em plasma (nmol/L).

A



B



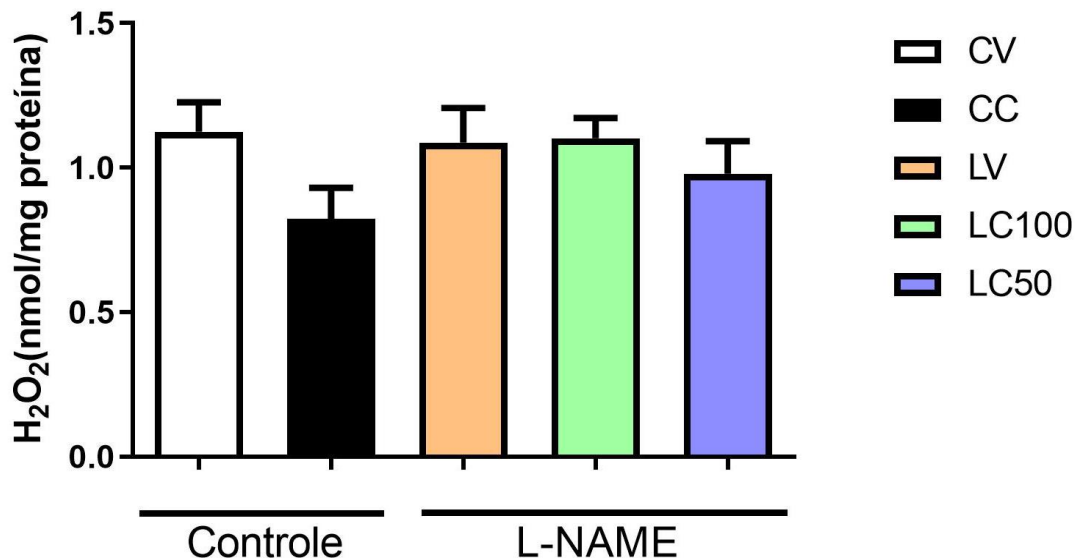
Fonte: Da Autora.

Legenda: Animais em tratamento durante um período de 14 dias. Número de animais: n=10-16 por grupo experimental. Erro padrão da média. A: TBARS no tecido renal. B: TBARS no plasma. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. * $p < 0,05$ versus CV; # $p < 0,05$ versus LV. Teste T Student. # $p < 0,05$ versus LV. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.6 DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

A Figura 12 representa os níveis de H_2O_2 em tecido renal e é possível perceber que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os cinco grupos experimentais ($p>0,05$).

Figura 12 – Efeito do uso da curcumina sobre os níveis de H_2O_2 no tecido renal (nmol/mg proteína).



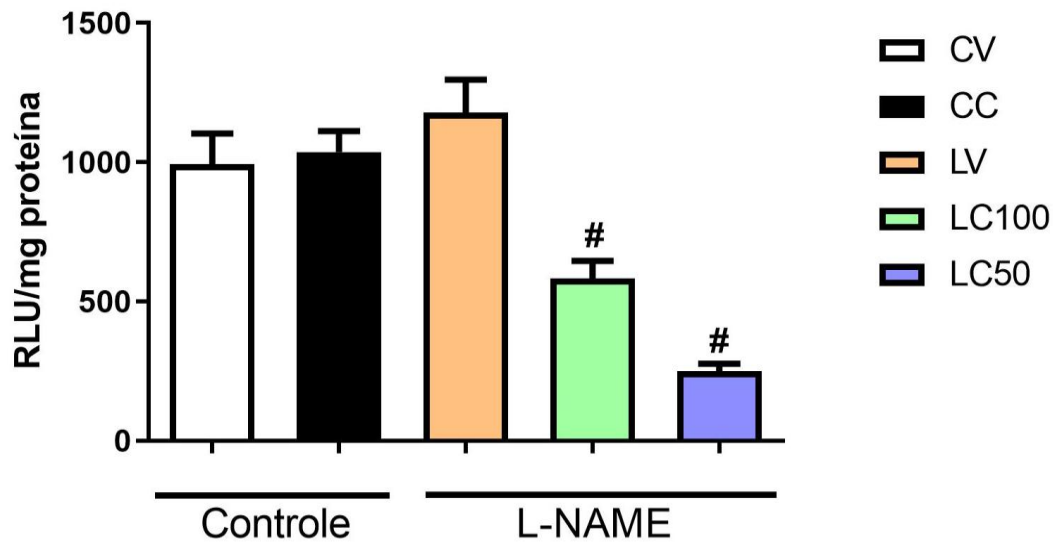
Fonte: Da Autora.

Legenda: Animais em tratamento durante um período de 14 dias. Número de animais: $n=10$ por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. $p>0,05$. Teste T Student. $p>0,05$. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.7 DETECÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$)

Conforme observado na Figura 13, a indução da hipertensão não promoveu um aumento significativo na produção de $O_2^{\cdot-}$ no grupo sem tratamento (LV) quando comparado ao grupo controle (CV) ($p<0,05$), e já o tratamento com curcumina levou a uma diminuição estatisticamente significativa tanto no grupo LC100 quanto no grupo LC50 ao comparar com o grupo hipertenso LV ($p<0,05$).

Figura 13 – Efeito do uso da curcumina sobre a produção de $O_2^{\cdot-}$ através da utilização da sonda lucigenina no tecido renal (RLU/mg proteína).



Fonte: Da Autora.

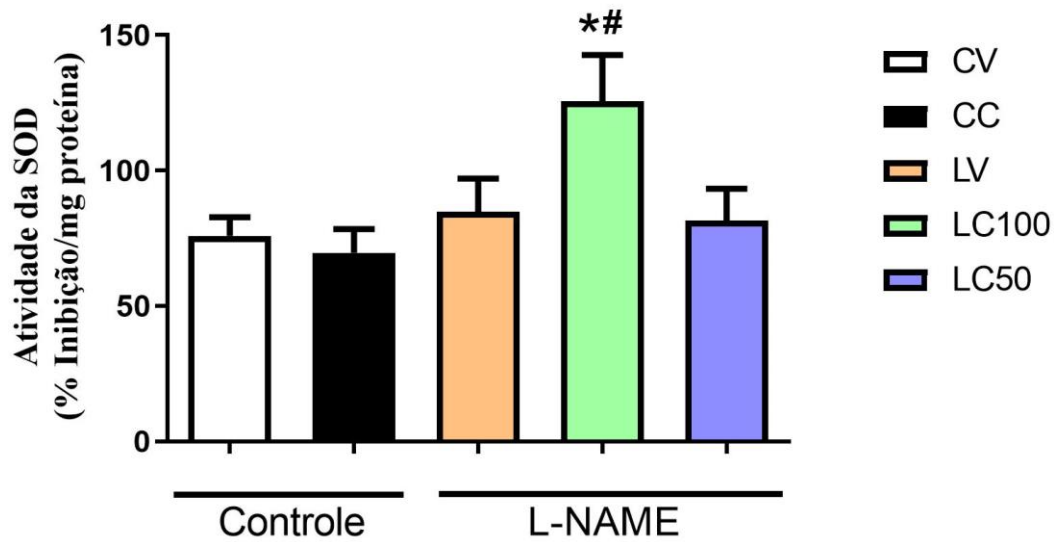
Legenda: Animais em tratamento durante um período de 14 dias. Número de animais: n=10 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. $p > 0,05$ versus CV; $^{\#}p < 0,05$ versus LV. Teste T Student. $^{\#}p < 0,05$ versus LV. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.8 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

6.8.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

Na Figura 14, é possível observar os resultados correspondentes à taxa de inibição da enzima SOD. Percebe-se que o grupo hipertenso tratado com curcumina LC100 apresentou um aumento estatisticamente significativo na atividade da enzima SOD quando comparado aos grupos CV e LV ($p < 0,05$), enquanto que o grupo LC50 não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado aos grupos CV e LV ($p > 0,05$).

Figura 14 – Efeito do uso da curcumina sobre a atividade da SOD no tecido renal (% Inibição/mg proteína).



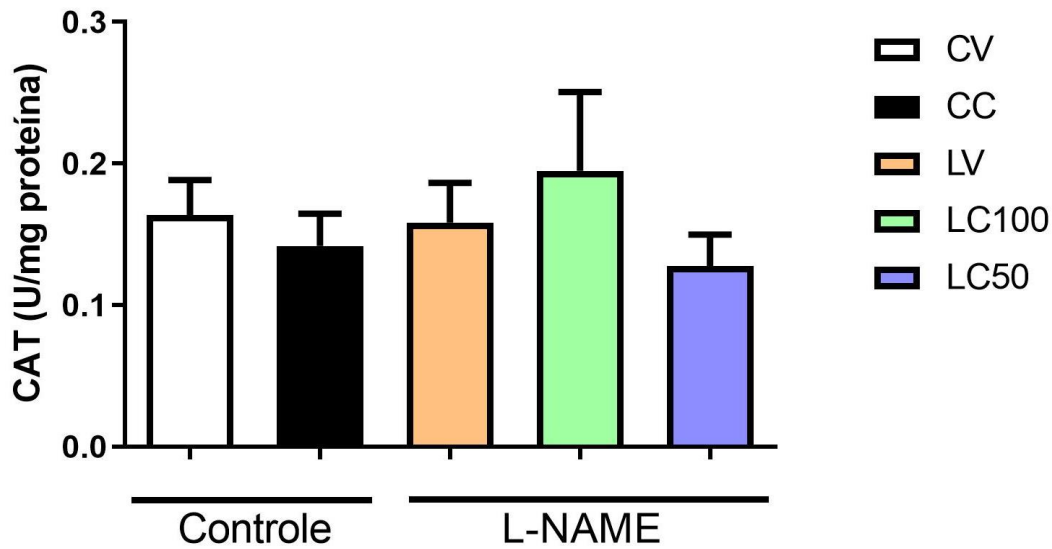
Fonte: Da Autora.

Legenda: Animais em tratamento durante um período de 14 dias. Número de animais: n=16 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. * $p < 0,05$ versus CV; # $p < 0,05$ versus LV. Teste T Student. $p > 0,05$. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.8.2 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A Figura 15 apresenta os resultados correspondentes à atividade da enzima CAT no tecido renal. Percebe-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os cinco grupos experimentais durante o período de estudo ($p > 0,05$).

Figura 15 – Efeito do uso da curcumina sobre a atividade da CAT no tecido renal (U/mg proteína).



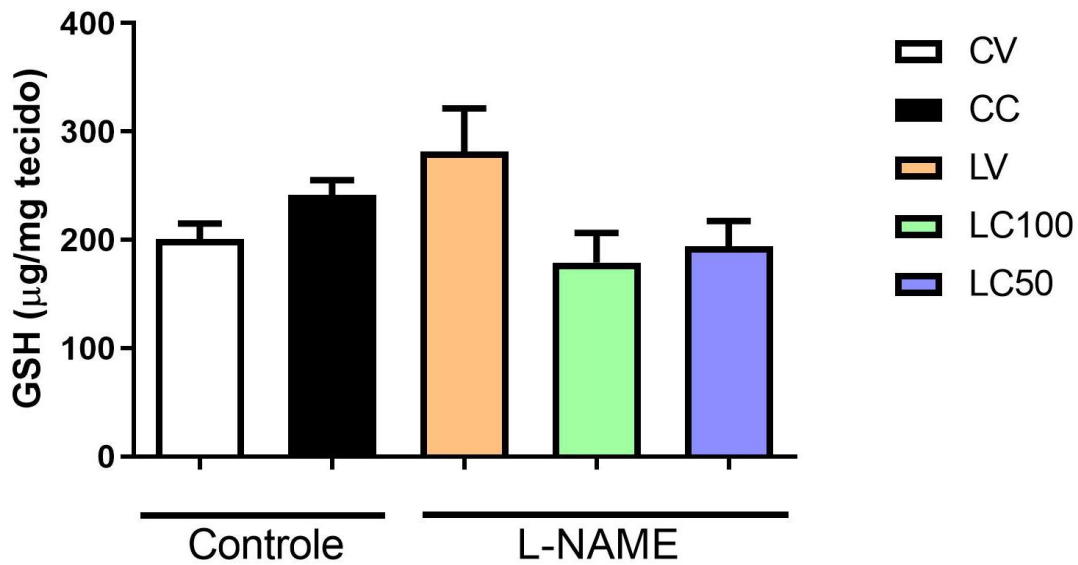
Fonte: Da Autora.

Legenda: Animais em tratamento durante um período de 14 dias. Número de animais: n=16 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. $p > 0,05$. Teste T Student. $p > 0,05$. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.8.3 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Conforme apresentado na Figura 16, os cinco grupos experimentais em estudo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si quanto aos níveis de GSH no tecido renal ($p > 0,05$).

Figura 16 – Efeito do uso da curcumina sobre os níveis de GSH no tecido renal ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido).



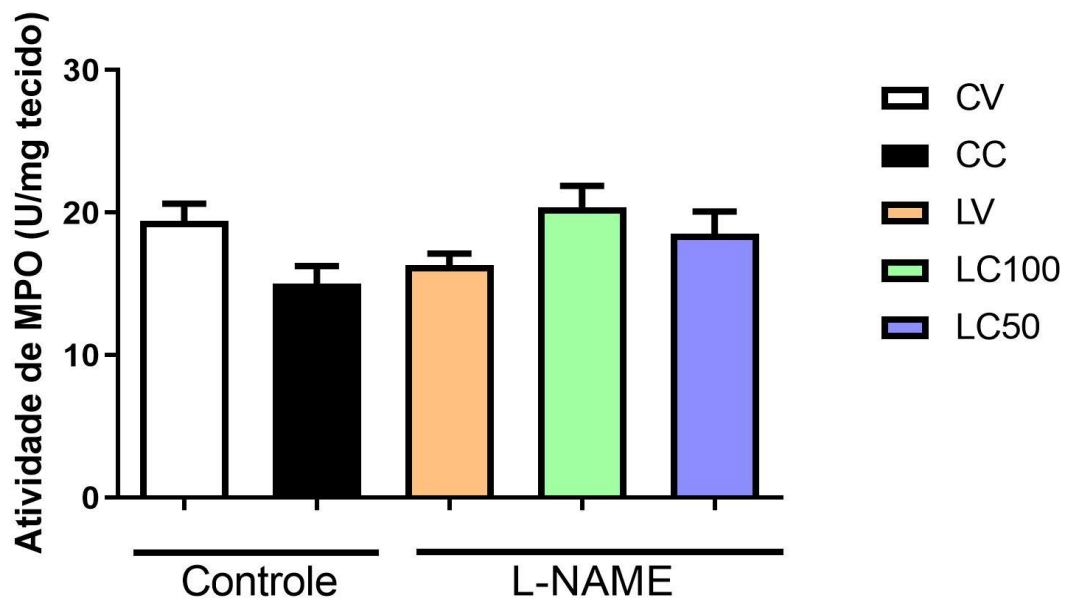
Fonte: Da Autora.

Legenda: Animais em tratamento durante um período de 14 dias. Número de animais: n=16 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. $p > 0,05$. Teste T Student. $p > 0,05$. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

Na Figura 17 encontram-se os resultados obtidos através da determinação da atividade de MPO no tecido renal. Percebe-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os cinco grupos em estudo ($p > 0,05$).

Figura 17 – Efeito do uso da curcumina sobre a atividade de MPO no tecido renal (U/mg proteína).



Fonte: Da Autora.

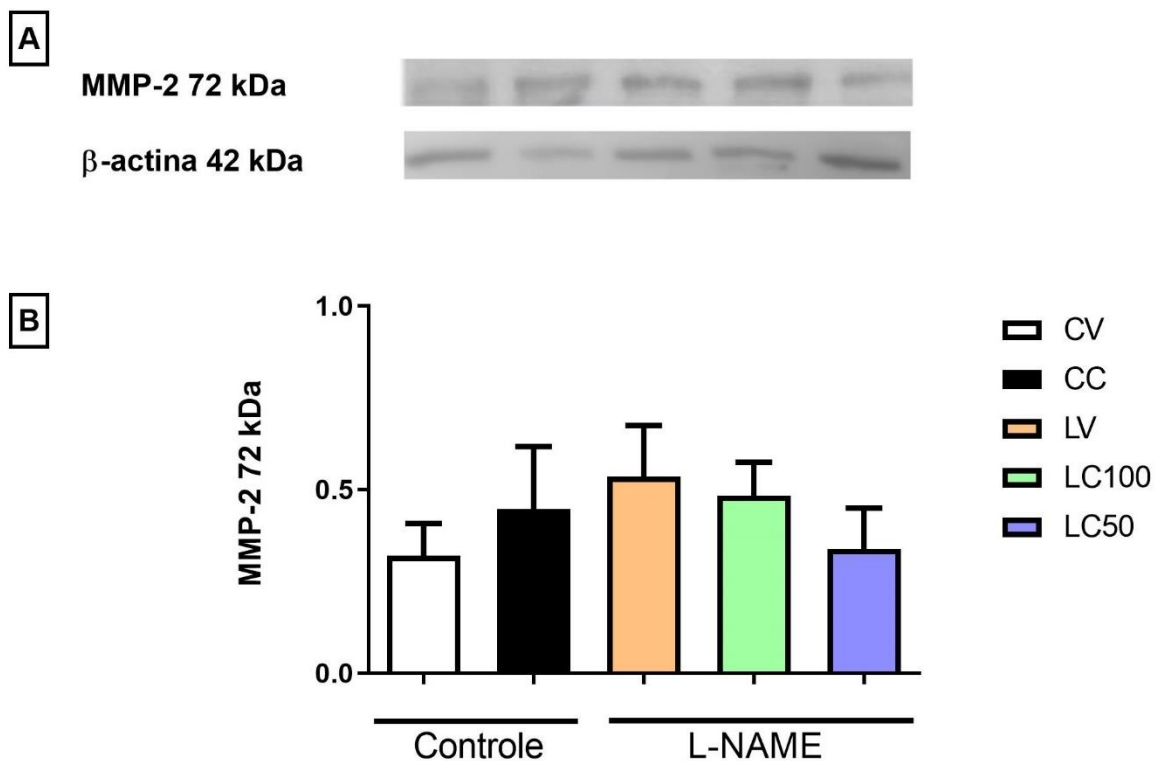
Legenda: Animais em tratamento durante um período de 14 dias. Número de animais: n=10 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. $p > 0,05$. Teste T Student. $p > 0,05$. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.10 WESTERN BLOTTING

6.10.1 Western Blotting de MMP-2

Na Figura 18 há a representação da expressão de MMP-2 no sobrenadante obtido a partir do homogenato do tecido renal. Percebe-se que os cinco grupos experimentais não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$).

Figura 18 – Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de MMP-2 por *Western blotting* (unidades arbitrárias).



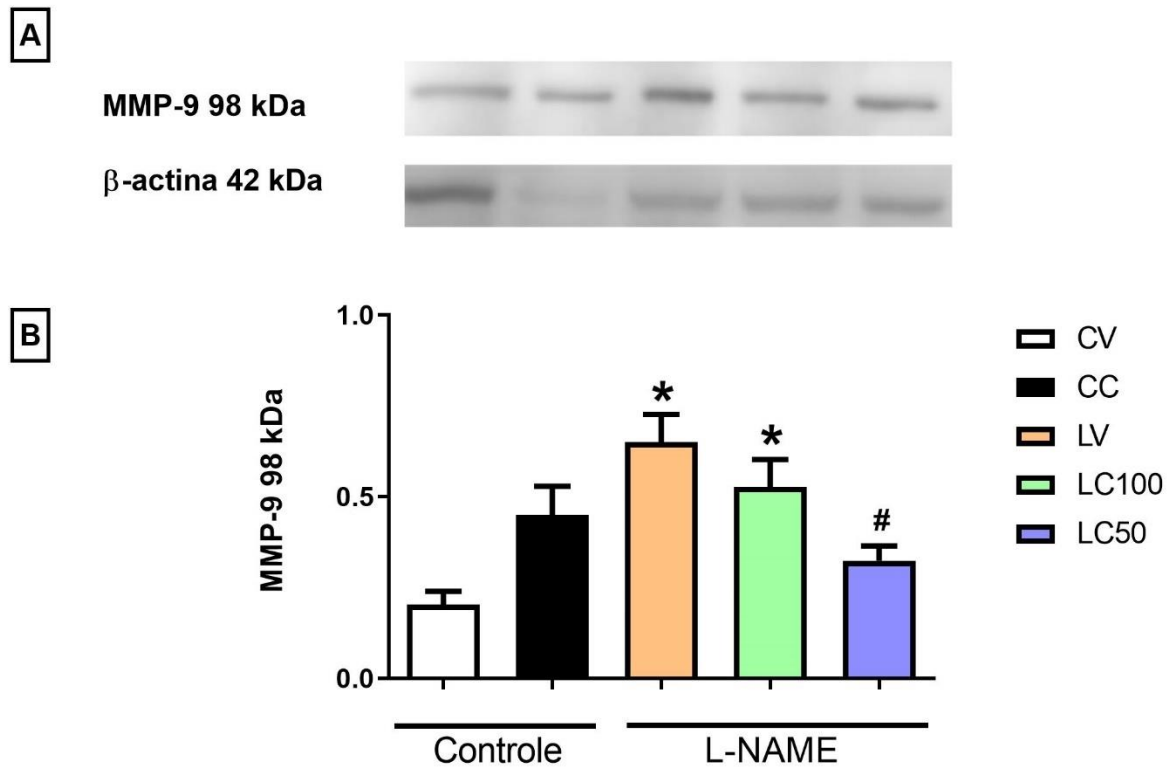
Fonte: Da Autora.

Legenda: Gel representativo, em escala de cinza, do *Western blotting* de extratos de rim de animais dos cinco grupos experimentais das bandas de 72 kDa de MMP-2 e da β -actina de 42 kDa (A). O painel B representa os valores das bandas de 72 kDa de MMP-2 corrigidas pela β -actina. Número de animais: n=4-6 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. $p > 0.05$. Teste T Student. $p > 0.05$. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.10.2 *Western Blotting* de MMP-9

A Figura 19 demonstra a representação da expressão de MMP-9 no sobrenadante obtido a partir do homogenato do tecido renal. Os animais do grupo LV e LC100 apresentaram aumento significativo da expressão de MMP-9 quando comparados ao grupo CV ($p < 0,05$). Entretanto, o grupo tratado com curcumina na dose de 50 mg/kg/dia (LC50) apresentou uma diminuição significativa da expressão de MMP-9 quando comparado ao grupo LV ($p < 0,05$).

Figura 19 – Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de MMP-9 por *Western blotting* (unidades arbitrárias).



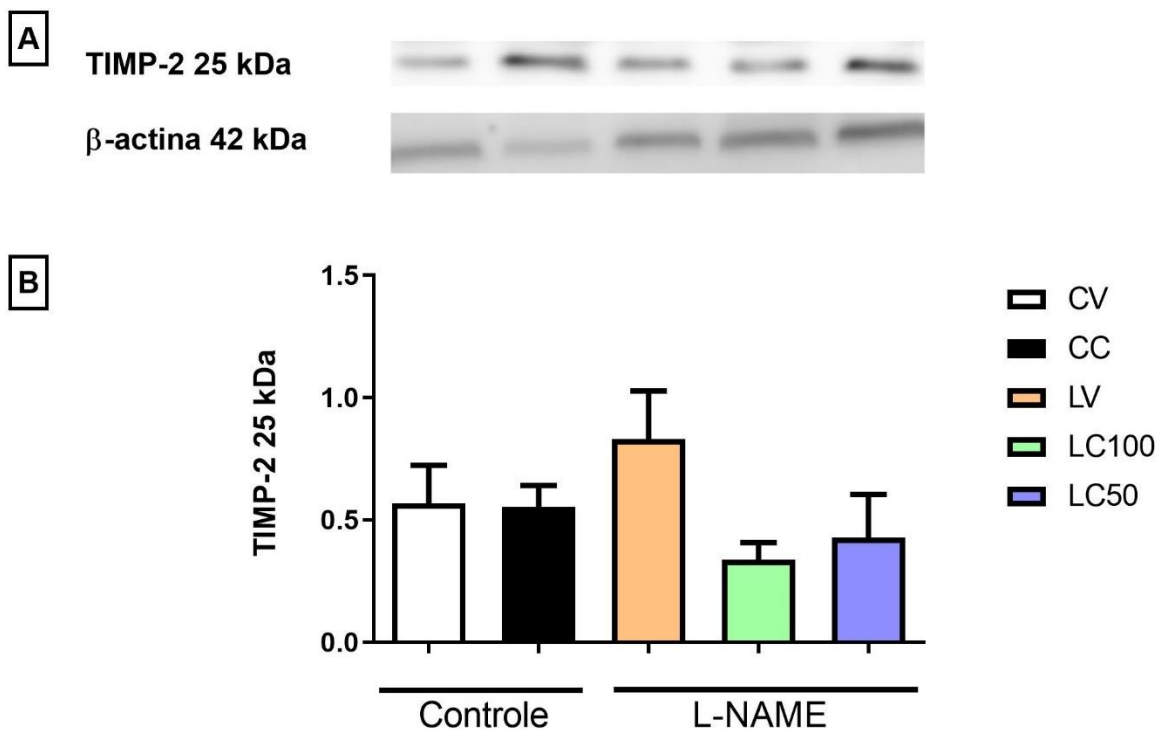
Fonte: Da Autora.

Legenda: Gel representativo, em escala de cinza, do *Western blotting* de extratos de rim de animais dos cinco grupos experimentais das bandas de 98 kDa de MMP-9 e da β -actina de 42 kDa (A). O painel B representa os valores das bandas de 98 kDa de MMP-2 corrigidas pela β -actina. Número de animais: n=5-6 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. * $p < 0,05$ versus CV. Teste T Student. # $p < 0,05$ versus LV. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.10.3 *Western blotting* de TIMP-2

Na Figura 20 há a representação da expressão das bandas de TIMP-2 no sobrenadante obtido a partir do homogenato do tecido renal. É possível verificar que os cinco grupos experimentais não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$).

Figura 20 – Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de TIMP-2 por *Western blotting* (unidades arbitrárias).



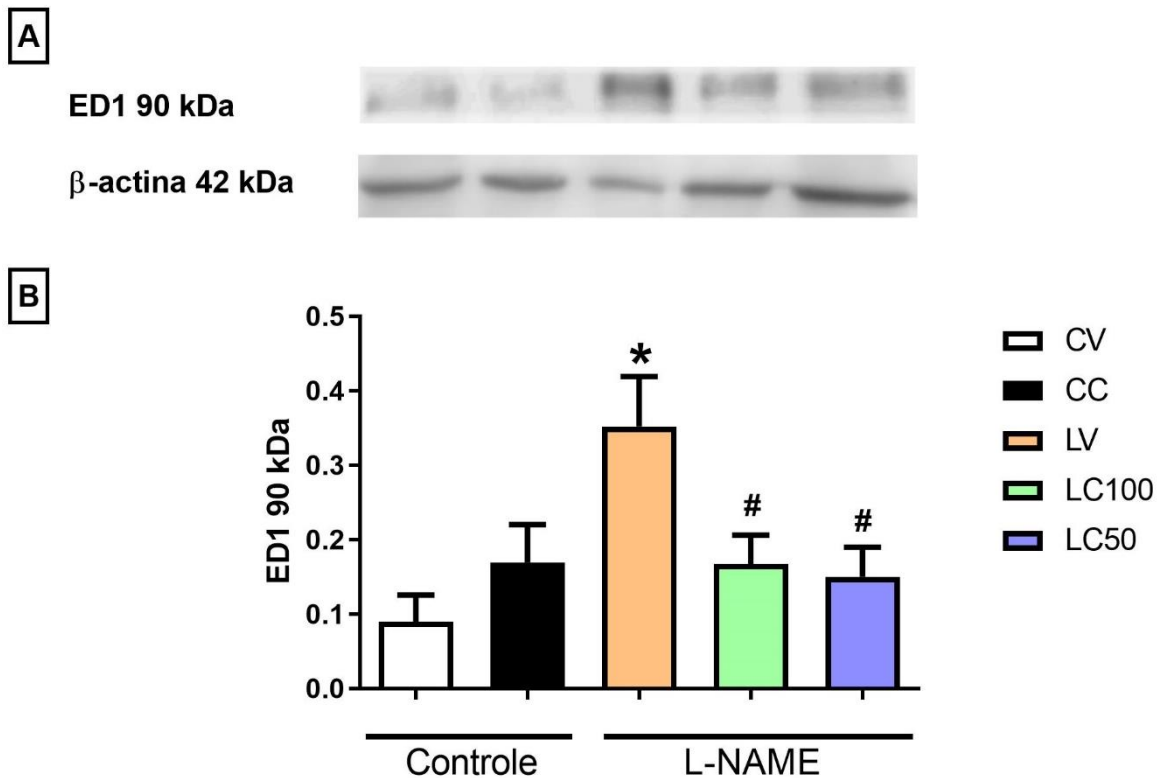
Fonte: Da Autora.

Legenda: Gel representativo, em escala de cinza, do *Western blotting* de extratos de rim de animais dos cinco grupos experimentais das bandas de 25 kDa de TIMP-2 e da β -actina de 42 kDa (A). O painel B representa os valores das bandas de 25 kDa de TIMP-2 corrigidas pela β -actina. Número de animais: n=4-6 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. $p > 0.05$. Teste T Student. $p > 0.05$. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.10.4 *Western blotting* de ED1

A Figura 21 demonstra a representação da expressão de ED1 no sobrenadante obtido a partir do homogenato do tecido renal. Os animais do grupo LV apresentaram aumento significativo da expressão de ED1 quando comparados ao grupo CV ($p < 0,05$). Além disso, os grupos tratados com curcumina (LC100 e LC50) apresentaram uma diminuição significativa da expressão de ED1 quando comparados ao grupo LV ($p < 0,05$).

Figura 21 – Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de ED1 por *Western blotting* (unidades arbitrárias).



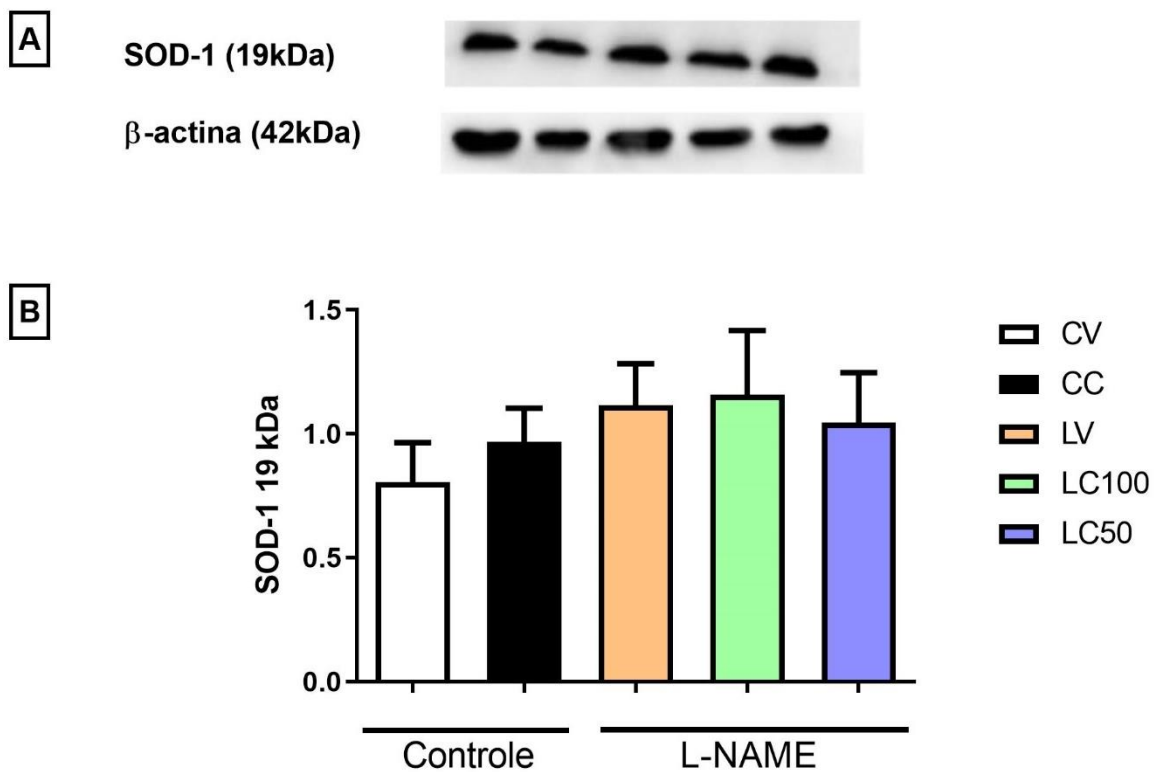
Fonte: Da Autora.

Legenda: Gel representativo, em escala de cinza, do *Western blotting* de extratos de rim de animais dos cinco grupos experimentais das bandas de 90 kDa de ED1 e da β -actina de 42 kDa (A). O painel B representa os valores das bandas de 90 kDa de ED1 corrigidas pela β -actina. Número de animais: n=5-6 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. * $p < 0,05$ versus CV; # $p < 0,05$ versus LV. Teste T Student. # $p < 0,05$ versus LV. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.10.5 *Western blotting* de SOD-1

Na Figura 22 há a representação da expressão de SOD-1 no sobrenadante obtido a partir do homogenato do tecido renal. Percebe-se que os cinco grupos experimentais não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$).

Figura 22 – Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de SOD-1 por *Western blotting* (unidades arbitrárias).



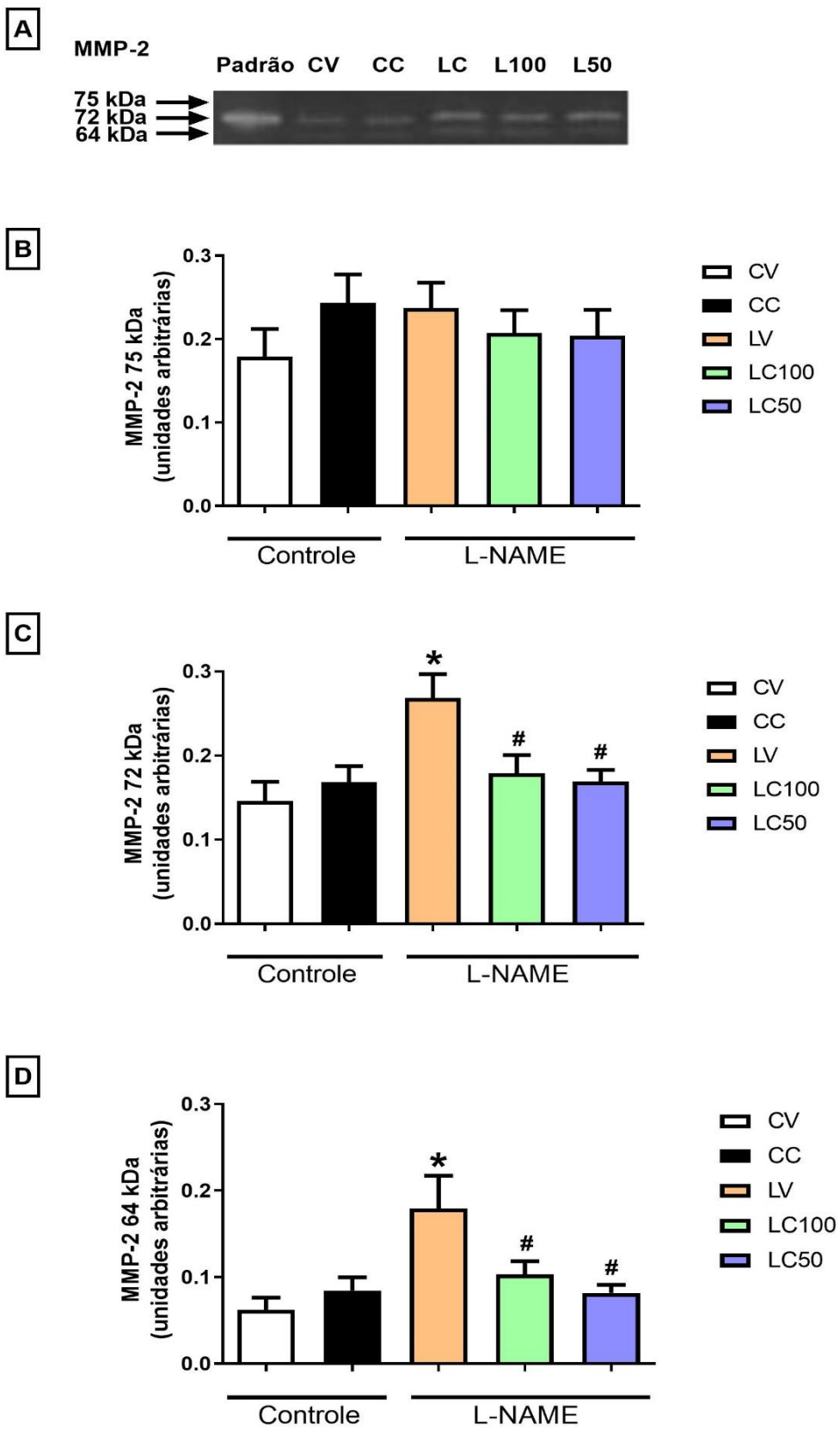
Fonte: Da Autora.

Legenda: Gel representativo, em escala de cinza, do *Western blotting* de extratos de rim de animais dos cinco grupos experimentais das bandas de 19 kDa de SOD-1 e da β -actina de 42 kDa (A). O painel B representa os valores das bandas de 19 kDa de SOD-1 corrigidas pela β -actina. Número de animais: n=4-6 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. $p>0.05$. Teste T Student. $p>0.05$. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.7 ZIMOGRÁFIA DE MMP-2

Na Figura 23 encontra-se um zimograma representativo dos extratos de tecido renal com os pesos moleculares das três bandas de MMP-2 (75 kDa, 72 kDa e 64 kDa). Verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os cinco grupos em estudo ($p>0,05$) para as bandas de 75 kDa (figura 11 B). Em relação às bandas de 72 kDa e 64 kDa, é possível perceber que o grupo hipertenso LV demonstrou níveis aumentados para ambas as bandas quando comparado ao grupo CV (figura 11 C-D; $p<0,05$); enquanto que os grupos tratados com curcumina (LC100 e LC50) atenuaram o aumento induzido pela hipertensão para ambas as bandas (figura 11 C-D; $p<0,05$).

Figura 23 – Efeito do uso da curcumina sobre a expressão de metaloproteinases de matrix do tipo 2 (MMP-2) por zimografia (unidades arbitrárias).



Fonte: Da Autora.

Legenda: Gel representativo, em escala de cinza, do zimograma de extratos de rim de animais dos cinco grupos experimentais (A). O painel B demonstra os valores das bandas de diferentes pesos moleculares da

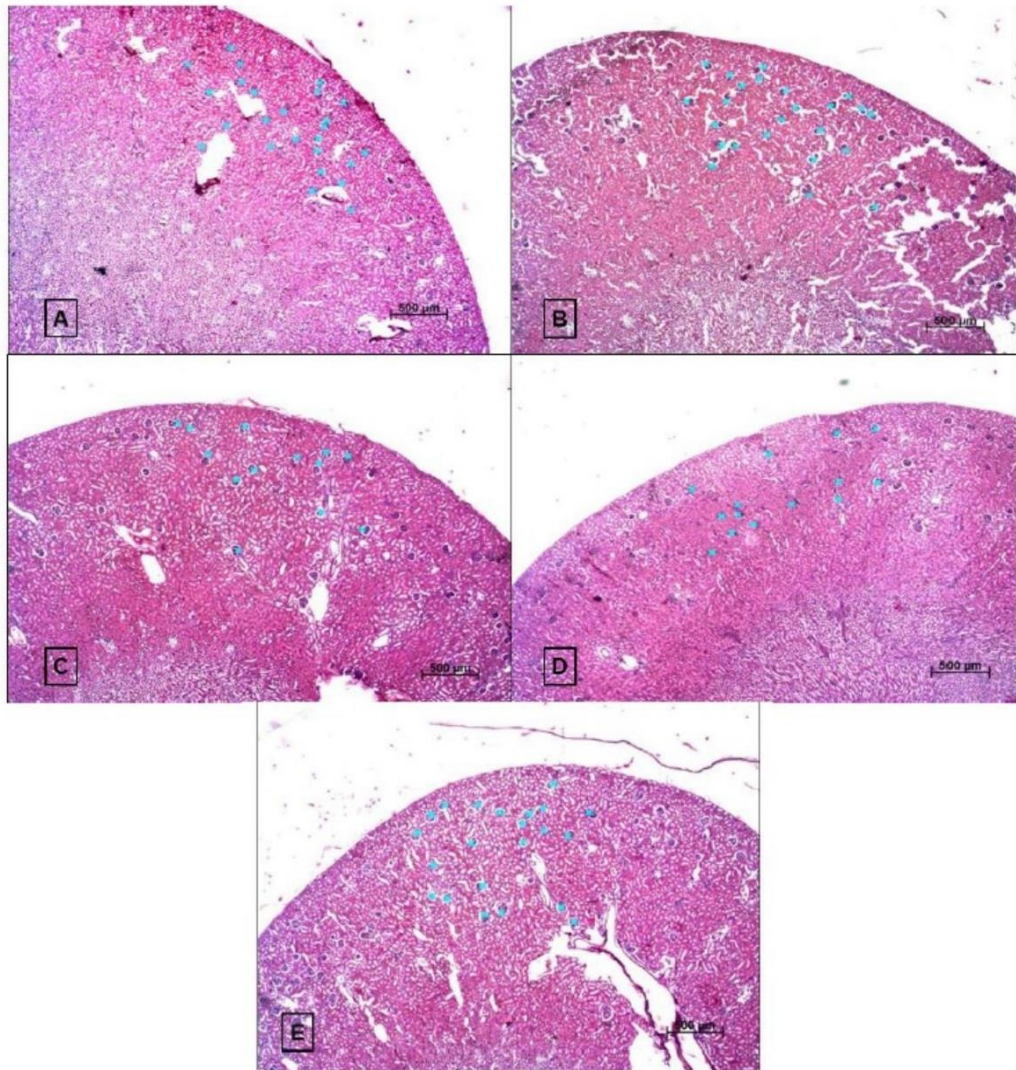
MMP-2 (75 kDa, 72 kDa, 64 kDa). Número de animais: n=9-10 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. * $p < 0,05$ versus CV; # $p < 0,05$ versus LV. Teste T Student. # $p < 0,05$ versus LV. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

6.12 AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA RENAL

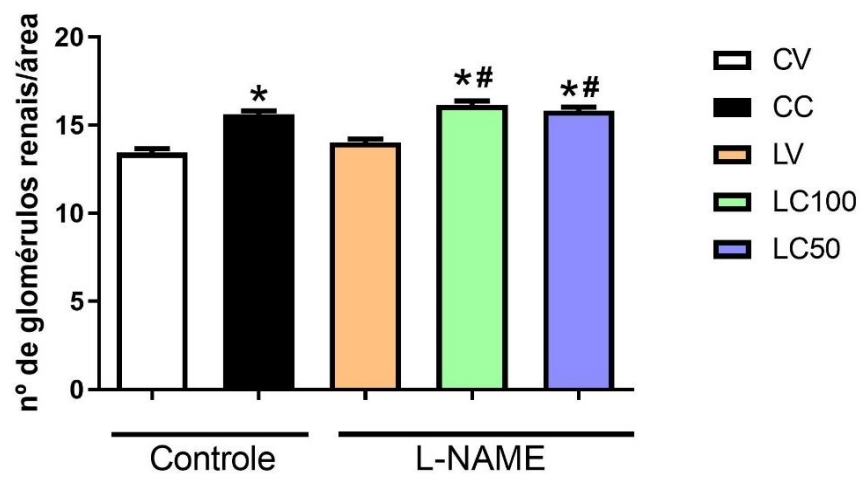
Na Figura 24 encontra-se a determinação do número de glomérulos por área em fotos do tecido renal dos cinco grupos experimentais no aumento de 5x. Percebe-se que os animais do grupo CC, LC100 e LC50 apresentaram aumento significativo no número de glomérulos quando comparados ao grupo CV ($p < 0,05$). Além disso, os grupos tratados com curcumina em ambas as doses (LC100 e LC50) apresentaram um aumento significativo no número de glomérulos quando comparado ao grupo LV ($p < 0,05$).

Figura 24 – Corte histológico do tecido renal direito para determinação do número de glomérulos por área.

1



2



Legenda: Representação de glomérulos (marcas de “x” em azul-claro) nos cinco grupos experimentais (A=CV; B=CC; C=LV; D=L100; E=L50) em tecido renal corado por hematoxilina e eosina no aumento de 5x (1). Determinação do número de glomérulos por área nos cinco grupos experimentais (2). Número de animais: n=9-10 por grupo experimental. Erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way*, seguido pelo teste *Tukey's post-hoc*. * $p < 0,05$ versus CV; # $p < 0,05$ versus LV. Teste T Student. # $p < 0,05$ versus LV. (CV: Controle + Veículo. CC: Controle + Curcumina. LV: L-NAME + Veículo. LC100: L-NAME + Curcumina 100 mg/kg/dia. LC50: L-NAME + Curcumina 50 mg/kg/dia).

7 DISCUSSÃO

Sabe-se que o óxido nítrico possui papel fundamental na manutenção do tônus vascular, na prevenção da agregação plaquetária e, principalmente, na regulação da pressão sanguínea, a qual pode sofrer alterações drásticas com a diminuição desta molécula (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Em nosso trabalho, os animais do grupo hipertenso LV apresentaram valores de pressão arterial maiores do que quando comparados ao grupo controle CV, tanto na primeira quanto na segunda semana de tratamento. Além disso, houve diferenças estatisticamente significativas quando os animais hipertensos foram tratados com curcumina. Esse resultado sugere que a indução da hipertensão através do uso de L-NAME ocorreu como o esperado e que o tratamento com a curcumina interfere de maneira significativa na redução da pressão arterial nos animais.

Segundo estudos promovidos por Linardi *et al.* (2004), o uso de L-NAME na dose de 80 mg/kg/dia por 4 semanas para a indução de hipertensão em ratos *Wistar* levou a um aumento significativo da pressão arterial dos animais quando comparados aos animais controle. Além disso, no estudo feito por Akinyemi *et al.* (2015), utilizando ratos machos *Wistar*, em um estudo utilizando L-NAME (40 mg/kg/dia) por 14 dias para a indução da hipertensão junto à suplementação de extratos de rizomas de gengibre e turmerico (cúrcuma) ou tratando com atenolol, verificou-se que houve uma redução significativa da pressão arterial nos animais hipertensos induzidos por L-NAME tratados com os extratos ou com o atenolol, quando comparados ao grupo hipertenso induzido por L-NAME sem tratamento.

Quanto à ação da curcumina nos animais hipertensos, em um estudo promovido por Greish e colaboradores (2020), a utilização de L-NAME (40 mg/kg/dia) para a indução de hipertensão em ratos *Wistar* por 4 semanas, e de maneira concomitante a gavagem de curcumina na dose de 100 mg/kg/dia durante 10 semanas, levou a um aumento significativo nos valores de pressão arterial nos animais do grupo apenas tratado com L-NAME quando comparados ao grupo controle não tratado, enquanto que os animais tratados com L-NAME e curcumina de maneira concomitante apresentaram uma diminuição significativa nos valores de pressão arterial. Em um outro estudo realizado por Nakmareong *et al.* (2011), verificou-se que em ratos machos *Sprague-Dawley* induzidos à hipertensão por L-NAME e tratados simultaneamente com curcumina na dose de 100 mg/kg/dia durante três semanas, houve uma diminuição significativa nos valores de pressão arterial quando comparados ao grupo induzido à hipertensão sem tratamento. Estes resultados corroboram nosso estudo, demonstrando a

capacidade da curcumina em levar a uma redução significativa da pressão arterial em um período de 14 dias neste modelo animal de hipertensão.

Em relação ao peso dos animais, é possível perceber que em nosso estudo não houve diferenças estatísticas significativas entre os 5 grupos experimentais, demonstrando que a curcumina não levou a alterações neste parâmetro (o que já era esperado), além de que os animais estavam com o peso considerado normal durante todo o tempo de estudo, não apresentando nenhum caso de peso fora da normalidade (ANIMAL RESOURCES CENTRE, 2021). Em um estudo promovido por Boonla e colaboradores (2014), verificou-se que ao induzir ratos *Wistar* com peso normal à hipertensão através do método de 2-rins-1-clipe ou pelo uso do L-NAME e tratando alguns dos grupos com curcumina nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia por 6 semanas, demonstrou-se que não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais para este parâmetro, o que corrobora nosso estudo.

Conforme a hipertensão se desenvolve, outras complicações podem vir a surgir como a angina, infarto, arritmia, derrame, e danos renais, que podem culminar em falência renal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). A hipertensão é uma das causas principais de insuficiência renal crônica devido a sua capacidade de promover efeitos nocivos na vasculatura renal através da pressão arterial elevada (BUFFET; RICCHETTI, 2012). A longo termo, a pressão arterial elevada pode causar um aumento na pressão intraglomerular, interferindo diretamente na filtração glomerular e, conseqüentemente, levando a um aumento desordenado de proteínas na urina (BUFFET; RICCHETTI, 2012).

Devido a isso, a avaliação da função renal é essencial para verificar e monitorar a presença de doenças renais, podendo assim auxiliar de maneira direta a determinação de um diagnóstico correto. Dentre os parâmetros bioquímicos disponíveis, a ureia e a creatinina são os mais utilizados. A ureia é o produto principal de excreção do metabolismo proteico, e em doenças renais, se acumula por não ser excretada normalmente, atingindo valores que ultrapassam os valores considerados normais, sendo que para ratos machos *Wistar* os valores são entre 26 e 58 mg/dL (DABLA, 2010; LIMA *et al.*, 2014). É possível perceber que em nosso estudo os animais dos cinco grupos experimentais não obtiveram valores estatisticamente diferentes para este parâmetro. Em estudos feitos por Abdel-Rahman e colaboradores (2017), a indução da hipertensão pelo uso de L-NAME em ratos machos Sprague-Dawley por quatro semanas resultou em alterações significativas nos valores de ureia quando comparados ao grupo controle. Em um outro estudo promovido por Adaramoye, Nwosu e Farombi (2012), um grupo de ratos *Wistar* foi tratado com L-NAME em um período de 3 semanas, enquanto que outro grupo foi tratado com L-NAME e curcumina na dose de 200 mg/kg/dia no mesmo período.

Neste estudo, verificou-se que os animais apenas tratados com L-NAME apresentaram uma elevação significativa nos valores de ureia quando comparados ao grupo controle, enquanto que os animais tratados com curcumina e L-NAME de maneira concomitante apresentaram uma diminuição significativa nos valores de ureia em relação aos animais somente tratados com L-NAME, demonstrando que a hipertensão induzida por este modelo leva a alterações nos valores de ureia e que a utilização de curcumina pode levar a uma diminuição destas taxas (ADARAMOYE; NWOSU; FAROMBI, 2012).

Um segundo parâmetro importante para verificar a função renal é a creatinina, a qual é um metabólito da creatina que está em sua maior parte localizada no músculo esquelético (DABLA, 2010). As mulheres normalmente possuem um valor mais baixo de creatinina do que os homens devido ao fato de terem menos massa muscular do que eles, e estes valores refletem diretamente sobre a massa muscular de cada indivíduo (DABLA, 2010). Os valores de referência encontrados na literatura para ratos *Wistar* são de 0,24 a 1,20 mg/dL (LIMA *et al.*, 2014). No presente estudo, é possível perceber que os valores encontrados de creatinina apresentaram uma diferença estatística significativa entre os grupos LV e CV, e também entre ambos os grupos tratados hipertensos (LC100 e LC50) quando comparados ao grupo LV, porém é importante ressaltar que mesmo o valor aumentado de creatinina no grupo LV não está acima do valor de referência encontrado na literatura, sendo portanto considerado normal (LIMA *et al.*, 2014). No estudo promovido por Akinyemi *et al.* (2015), verificou-se que em ratos machos *Wistar* induzidos à hipertensão por L-NAME e tratados com curcumina por 14 dias houve uma diminuição significativa dos níveis de creatinina quando comparados ao grupo hipertenso sem tratamento. No estudo promovido por Greish e colaboradores (2020), utilizando-se L-NAME para indução da hipertensão por 4 semanas e curcumina na dose de 100 mg/kg/dia por 10 semanas em ratos *Wistar*, verificou-se que houve um aumento significativo nos valores de creatinina sérica no grupo hipertenso sem tratamento quando comparado ao controle, e também houve uma diminuição significativa no grupo hipertenso tratado com curcumina quando comparado ao grupo hipertenso sem tratamento. Verifica-se então que para ambos os parâmetros bioquímicos (ureia e creatinina), não houve diferenças significativas que possam ser consideradas clínicas entre os grupos estudados. No período proposto deste estudo, essas alterações não foram detectadas, o que sugere que um tempo mais longo poderia levar a alterações primeiramente na ureia, e depois na creatinina dos animais tratados.

Um dos mais fundamentais mecanismos para o desenvolvimento da hipertensão arterial é o estresse oxidativo, o qual resulta de um excesso de ERO que não pode ser contrabalanceado por enzimas antioxidantes (GONZÁLES *et al.*, 2014). A peroxidação lipídica ocorre através de

radicais livres que atacam lipídeos que apresentem ligações duplas de carbono, principalmente ácidos graxos poli-insaturados, podendo levar ao dano celular, facilitando o desenvolvimento de diversas patologias e do envelhecimento (AYALA; MUNOZ; ARGUELLES, 2014). Um dos principais produtos provenientes do desenvolvimento da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), sendo um produto extremamente tóxico e mutagênico (AYALA; MUNOZ; ARGUELLES, 2014). Em nosso estudo, é possível perceber que houve um aumento significativo da peroxidação lipídica no grupo LV quando comparado ao grupo CV ($p < 0,05$), e que o tratamento com curcumina promoveu uma diminuição significativa na dose de 50mg/kg/dia neste parâmetro quando comparado ao grupo hipertenso LV ($p < 0,05$). Este resultado é corroborado pelo estudo feito por Kukongviriyapan e colaboradores (2014), no qual animais que foram submetidos ao modelo de hipertensão por indução de cádmio apresentaram um aumento de MDA no plasma quando comparados ao grupo controle, e que o tratamento com curcumina nas doses de 100 e 50 mg/kg/dia apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de MDA no plasma quando comparados ao grupo hipertenso sem tratamento. Entretanto, quanto à determinação de TBARS no tecido renal é possível perceber que não houve diferenças significativas entre os cinco grupos experimentais ($p > 0,05$). No estudo de Bayrak e colaboradores (2008), verificou-se que no modelo de isquemia e perfusão renal utilizando a curcumina como tratamento, houve uma diminuição nos níveis de MDA no tecido renal, demonstrando uma diminuição nos níveis de peroxidação lipídica renal de maneira geral. No estudo promovido por Greish e colaboradores (2020), os animais com hipertensão induzida por L-NAME apresentaram um aumento nos níveis de MDA no tecido renal quando comparados ao controle, e já os animais hipertensos tratados com curcumina tiveram uma diminuição significativa desses níveis quando comparados aos animais hipertensos sem tratamento, o que também se diferencia do nosso estudo. Além disso, o estudo promovido por Boonla e colaboradores (2014) demonstrou que animais induzidos à hipertensão através do modelo de 2-rins-1-clipe apresentaram um aumento nos níveis de MDA no plasma quando comparados ao controle, e que tanto os animais hipertensos tratados com curcumina na dose de 50 mg/kg/dia quando os animais tratados na dose de 100 mg/kg/dia por um período de 6 semanas apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de MDA quando comparados ao grupo hipertenso sem tratamento, o que também se diferencia do nosso estudo. É importante ressaltar que houve alterações significativas que demonstram a atuação da curcumina como antioxidante no plasma e que os estudos obtidos na literatura para a determinação de TBARS no tecido renal apresentam um tempo maior de tratamento, tanto com a indução do L-NAME, quanto com a

curcumina, o que pode sugerir que em um tratamento mais prolongado poderia ser possível observar alterações significativas no tecido renal quanto à peroxidação lipídica neste estudo.

O H_2O_2 é gerado a partir do radical $O_2^{\cdot-}$, o qual é produzido pela mitocôndria e pelas NADPH oxidases (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). O $O_2^{\cdot-}$ resulta da redução de um elétron do oxigênio molecular (O_2) que, dentro da célula, é convertido rapidamente para H_2O_2 por meio de enzimas SOD (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). No presente estudo, verificou-se que não houve alterações significativas entre os cinco grupos experimentais quanto à produção de H_2O_2 . No estudo de Landmesser e colaboradores (2003), verificou-se que ao utilizar ratos machos *Sham* C57BL/6 tratados com L-NAME (1mM), não houve diferenças estatisticamente significativas nas aortas dos animais tratados quando comparados ao controle. Já segundo o estudo de Moningka *et al.* (2012), ao tratar ratos machos *Sprague-Dawley* com L-NAME IV na dose de 1,5 mg/100 g de peso corporal, seguido de 150 mg/L na água para os animais beberem por um período de 4 a 6 semanas, verificou-se que houve um aumento na produção de H_2O_2 nos animais tratados com L-NAME quando comparados aos animais sem tratamento, demonstrando que possivelmente em dose e períodos maiores, seria possível também verificar um aumento na produção de H_2O_2 em nosso estudo.

As enzimas NADPH oxidases são as únicas enzimas conhecidas que são específicas para a produção de ERO nos rins (JHA *et al.*, 2017). A produção de $O_2^{\cdot-}$ por essas enzimas está diretamente ligada a inúmeras patologias glomerulares, e a inibição de sua atividade pode levar a uma melhora na ação dos podócitos, com conseqüente diminuição da albuminúria (HOLTERMAN *et al.*, 2015). No trabalho apresentado, verificou-se que na técnica de quimiluminescência para a determinação da sonda lucigenina tanto o grupo LC100 quanto o grupo LC50 apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa quando comparados ao grupo LV, ainda que este não tenha apresentado diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao grupo CV, demonstrando que a curcumina pode contribuir para a diminuição de produção de $O_2^{\cdot-}$ em ambas as doses. No estudo de Jan-On e colaboradores (2020), ao tratar ratos machos *Sprague-Dawley* com L-NAME na dose de 50 mg/kg/dia na água para os animais beberem por 6 semanas, observou-se que houve um aumento significativo na produção de $O_2^{\cdot-}$ em aortas quando comparado ao grupo controle, o que se diferencia do nosso estudo. Em um outro estudo feito por Boonla e colaboradores (2013), animais machos *Sprague-Dawley* foram submetidos à hipertensão renal pelo método de Goldblatt (2-rins-1-clipe) e receberam curcumina nas doses de 50 ou 100 mg/kg/dia por 6 semanas. Verificou-se que as aortas dos animais hipertensos sem tratamento com curcumina apresentaram um aumento significativo nos níveis de $O_2^{\cdot-}$ quando comparados ao controle, diferenciando-se do nosso

estudo; entretanto, os grupos de animais tratados com curcumina em ambas as doses apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de $O_2^{\cdot-}$ quando comparados ao grupo hipertenso sem tratamento, o que corrobora nosso estudo (BOONLA *et al.*, 2014).

A enzima SOD, assim como as enzimas catalase e GPx são consideradas como o principal sistema de defesa antioxidante do organismo. A SOD por sua vez, é responsável por sequestrar especificamente os ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), catalisando a sua reação para formar O_2 e H_2O_2 (LEI *et al.*, 2015). Considerando-se estas informações, é possível evidenciar que no presente estudo houve diferenças significativas entre o grupo hipertenso tratado LC100 e ambos os grupos CV (controle) e LV (hipertenso sem tratamento com curcumina) estudados, demonstrando que na dose de 100 mg/kg/dia, a curcumina promoveu um aumento na atividade desta enzima. Em um estudo promovido por Cardoso e colaboradores (2013), verificou-se que no sangue e nos tecidos renais de animais hipertensos induzidos por L-NAME por um período de 6 semanas, houve uma diminuição significativa na atividade da SOD quando comparados ao grupo controle. Em um outro estudo promovido por Ali *et al.* (2018), verificou-se que ao utilizar um modelo de doença renal crônica em ratos, tratando-os por 5 semanas com curcumina em diversas doses, houve um aumento significativo na atividade da SOD nos tecidos renais de ratos tratados somente com curcumina nas doses de 75 e 150mg/kg sem a doença; e também nos animais doentes tratados com curcumina em ambas as doses quando comparados ao grupo controle doente. Já no estudo feito por Greish e colaboradores (2020), o tratamento com curcumina na dose de 100 mg/kg/dia por 10 semanas no modelo de indução da hipertensão por L-NAME demonstrou um aumento nos valores de SOD em tecidos renais quando comparado ao grupo hipertensivo não tratado com curcumina, o que corrobora nossos estudos.

Além disso, há três isoformas desta enzima, sendo que a isoforma citoplasmática Cu/Zn SOD (SOD-1) tem sido demonstrada como um marcador para o estresse oxidativo em pacientes com doença renal terminal (PAWLAK; PAWLAK; MYSLIWIEC, 2005). No presente estudo, é possível perceber que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os cinco grupos experimentais. Nossos resultados são corroborados pelo estudo de Majzunova e colaboradores (2019), em que utilizando ratos *Wistar* tratados com L-NAME (50 mg/kg/dia) na água para os animais beberem por um período de 6 semanas, não apresentou diferenças estatisticamente significativas na expressão de SOD-1 quando comparado ao grupo controle sem tratamento.

A catalase (CAT) é uma enzima que possui a capacidade de converter o H_2O_2 em água e O_2 , estando localizada principalmente nos peroxissomos celulares e no citosol e sendo bastante importante na proteção celular quando em altas taxas de estresse oxidativo

(WASSMANN; WASSMANN; NICKENIG, 2004). No estudo aqui apresentado, é possível perceber que não houve alterações estatisticamente significativas entre os cinco grupos estudados. No estudo de Bayrak e colaboradores (2008), verificou-se que em um modelo de isquemia e reperfusão crônica renal, tratando os animais com curcumina na dose de 200 mg/kg por 7 dias, houve um aumento na atividade da enzima catalase no tecido renal, assim como na da SOD e nos níveis de GPx. Em um outro estudo feito por Tapia *et al.* (2013), verificou-se que em um modelo de nefrectomia de ratos, ao tratar os animais com curcumina na dose de 120 mg/kg durante o período cirúrgico (30 dias) e 30 dias após este período, preveniu-se o decréscimo das atividades da CAT, da SOD e da GPx no tecido renal. Entretanto, no estudo promovido por Greish e colaboradores (2020), o tratamento com curcumina nos animais hipertensos não demonstrou diferenças significativas quando comparado aos animais hipertensos não tratados, o que corrobora nosso estudo.

A glutatona reduzida (GSH) possui papel essencial em diversas vias bioquímicas, como na regulação do estado redox intracelular (WASSMANN; WASSMANN; NICKENIG, 2004). Já a enzima glutatona peroxidase (GPx) tem a capacidade de converter o H_2O_2 em água e O_2 , através da oxidação da glutatona reduzida em glutatona dissulfeto (WASSMANN; WASSMANN; NICKENIG, 2004). Neste contexto, percebe-se que no presente estudo não houve diferenças estatísticas entre os cinco grupos experimentais. No estudo promovido por Ali *et al.* (2018), verificou-se que utilizando o modelo de doença renal crônica nos animais e tratando com a curcumina em várias doses, observou-se que, nas doses de 75 e 150 mg/kg, houve um aumento significativo da GSH no tecido renal tanto nos animais doentes quanto nos animais controle, diferenciando-se do nosso estudo. Além disso, em um outro estudo feito por Nakmareong e colaboradores (2011), verificou-se que em aortas de animais hipertensos através do uso de L-NAME, tratados com curcumina nas doses de 50 e 100 mg/kg por um período de 3 semanas, houve um aumento nos níveis de GSH nos grupos tratados quando comparados ao grupo hipertenso sem tratamento, o que também diferencia-se do nosso estudo. Devido a estes resultados, é possível sugerir que, com um tempo maior de tratamento, os nossos animais hipertensos não tratados poderiam vir a apresentar uma diminuição na atividade da GPx e da CAT, e os tratados com curcumina poderiam apresentar um aumento na atividade destas enzimas.

Em doenças glomerulares ou tubulointersticiais, diversas espécies reativas de oxigênio podem contribuir para modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (MALLE; BUCH; GRONE, 2003). Neste contexto, a mieloperoxidase (MPO) é uma proteína heme que tem a habilidade de gerar ácido hipocloroso ou hipoclorito ($HOCl/OCl^-$) a partir de peróxido de

hidrogênio e ânions cloreto, sendo que estas espécies reativas podem produzir proteínas clorinadas e adutos lipídicos que causam disfunção celular em diferentes regiões renais (MALLE; BUCH; GRONE, 2003). Além disso, a aderência de neutrófilos na membrana basal glomerular assim como a sua degradação pela presença de oxidantes demonstra ter interação direta com o envolvimento da MPO (MALLE; BUCH; GRONE, 2003). No estudo aqui apresentado, percebe-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os cinco grupos experimentais quanto a determinação da atividade de MPO. No estudo promovido por Alp Yildirim e colaboradores (2015), fez-se o tratamento de ratos machos *Wistar* com L-NAME (60 mg/kg/dia) na água dos animais beberem por um período de 5 semanas e verificou-se que os níveis plasmáticos de MPO estavam aumentados nos animais tratados quando comparados ao grupo controle, diferenciando-se do nosso estudo. Em um outro estudo promovido por Gandhi, Zalawadia e Balaraman (2008), verificou-se que utilizando-se um modelo de isquemia e reperfusão renal com a aplicação de L-NAME (10 mg/kg/dia) após a nefrectomia por 15 dias, observou-se que os animais tratados com L-NAME apresentaram uma atividade significativamente maior do que os animais sem o tratamento, o que também se diferencia de nosso estudo. É importante ressaltar que em nosso modelo, a dose e o período utilizados de tratamento com L-NAME são diferentes dos encontrados na literatura e, em vista deste aspecto, sugerimos que um período mais longo de tratamento poderia levar a alterações na atividade de MPO.

As alterações vasculares e teciduais renais são promovidas por diversas enzimas, sendo as metaloproteinases de matriz (MMPs) importantes representantes. Estas enzimas são endopeptidases zinco-dependentes que possuem funções importantes tanto para a homeostase quanto para o desenvolvimento dos tecidos, além de também estarem diretamente relacionadas ao *turnover* celular (CATANIA; CHEN; PARRISH, 2007). A maior parte das MMPs estão presentes nos rins, podendo ser localizadas em regiões diferentes de acordo com cada espécie (PARRISH, 2017). As MMPs em condições normais são reguladas em 4 níveis: transcrição; ativação de seus precursores, conhecidos como zimogênios; interação direta com a matriz extracelular; e por fim, a inibição de suas ações através dos seus inibidores teciduais específicos, os TIMPs (DIMAS; ILIADIS; GREKAS, 2013). Entre as classes de MMPs, existem duas que pertencem à classe das gelatinases: a MMP-2 e a MMP-9. A MMP-2 possui a capacidade de degradar principalmente colágeno do tipo IV, fibronectina, laminina, elastina, gelatina, além de alguns substratos não provenientes da matriz, como o plasminogênio (DIMAS; ILIADIS; GREKAS, 2013). Já a MMP-9 degrada alguns constituintes da matriz extracelular, como colágeno do tipo IV, gelatina e agrecano (proteoglicano); também degradando outros substratos

não presentes na matriz, como a transferrina-carboximetilada e o plasminogênio (DIMAS; ILIADIS; GREKAS, 2013).

As MMP-2 são enzimas que através da técnica de zimografia em roedores, são identificadas as bandas de 75 kDa, 72 kDa e 64 kDa principalmente, enquanto que em humanos são identificadas apenas as bandas de 72 kDa e 64 kDa (as quais são mais ativadas) (CASTRO *et al.*, 2009; KANDASAMY *et al.*, 2010). As MMPs inicialmente encontram-se latentes e inativas, chamadas pró-MMPs (72 kDa), devido ao fato de conterem pró-peptídeos em sua constituição (KANDASSAMY *et al.*, 2009). Estas podem ser modificadas através de clivagem proteolítica, tornando-se ativas (64 kDa), ou podem também ser ativadas diretamente enquanto pró-MMPs através de ativação por estresse oxidativo (KANDASAMY *et al.*, 2010). No estudo aqui apresentado, verificou-se através da técnica de zimografia que não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais para as bandas de 75 kDa de MMP-2, porém para as bandas de 72 kDa e 64 kDa houve um aumento significativo ao comparar os grupos LV com CV, e uma diminuição significativa comparar os grupos LC50 e LC100 com o grupo LV. Verificou-se através da técnica de *Western blotting* que não houve diferenças estatísticas significativas entre todos os grupos experimentais para as bandas de 72 kDa, diferente do apresentado pela técnica de zimografia. Neste contexto, é possível perceber que em nosso estudo tanto as pró-MMPs (72 kDa) quanto os resultados provenientes da MMP ativada por clivagem proteolítica (64 kDa) apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos LV e CV, e também entre os grupos LC100 e LC50 quando comparados ao grupo LV, sugerindo que as MMP-2 estão sendo ativadas, seja por estresse oxidativo ou outras vias (KANDASAMY *et al.*, 2010). Segundo um estudo feito por Rizzi e colaboradores (2019), utilizando o modelo de hipertensão 2-rins-1-clipe em ratos *sham*, verificou-se que devido à hipertensão desenvolvida, houve um aumento nos níveis de MMP-2 (tanto 72 kDa quanto 64 kDa) em aortas tanto através da técnica de *Western blotting* quanto através da técnica de zimografia. Já em um estudo promovido por Yang e colaboradores (2008), utilizando um modelo de indução à hipertensão com L-NAME por 30 dias em ratos espontaneamente hipertensos, verificou-se que após 15 dias houve um aumento nos níveis de MMP-2 através das técnicas de ELISA e RT-PCR no tecido renal. Além disso, no estudo de Boonla e colaboradores (2014), verificou-se que, em animais induzidos à hipertensão pelo modelo 2-rins-1-clipe e tratados com curcumina nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia, utilizando a técnica de imuno-histoquímica, houve um aumento nos níveis de MMP-2 em aortas dos animais hipertensos sem tratamento, e os grupos dos animais tratados com ambas as doses de curcumina apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de MMP-2 quando comparados ao grupo hipertenso sem tratamento.

Diante dos estudos apresentados, é possível perceber que em nosso estudo a curcumina foi capaz de atenuar os níveis de MMP-2, o que é semelhante a grande parte dos estudos encontrados na literatura. Devido a isso, há um grande indicativo de que a curcumina possui esta capacidade de atenuar os níveis de MMP-2 em animais hipertensos pelo modelo de hipertensão utilizando o L-NAME mesmo em um período reduzido de tratamento.

É importante salientar que a técnica de zimografia tem por objetivo identificar a atividade proteolítica das MMPs separadas em bandas em gel de poliacrilamida e gelatina, demonstrando a capacidade destas enzimas em degradar a gelatina presente no gel (são gelatinases); enquanto que a técnica de *Western blotting* possui a capacidade de detectar proteínas específicas mesmo em meio a uma mistura de proteínas diferentes, utilizando anticorpos que sejam específicos para a proteína em estudo (GWOZDZ; DOREY, 2017; KLEINER, STLETER-STEVENSON, 1994). Levando isto em consideração, ao utilizarmos a técnica de *Western blotting* em nosso estudo para determinar os níveis de MMP-9, verificamos que houve um aumento significativo nestes níveis quando comparamos o grupo hipertenso LV com o grupo controle CV, enquanto que houve uma diminuição significativa quando comparamos o grupo LC50 com o grupo LV, demonstrando a capacidade da curcumina em atenuar os níveis da MMP-9 nos animais hipertensos. Em um estudo promovido por Sangartit *et al.* (2014), utilizando um modelo de indução à hipertensão por cádmio e tratando os animais com tetrahidrocurcumina (um metabólito da curcumina), verificou-se que em aortas dos animais tratados com esta substância, houve uma diminuição significativa nos níveis tanto da MMP-2 quanto da MMP-9 quando comparados ao grupo sem tratamento. No estudo feito por Yang e colaboradores, verificou-se que após 15 dias, os animais induzidos à hipertensão por L-NAME apresentaram um aumento significativo nos níveis de MMP-9 no tecido renal tanto pelo método de ELISA quanto por RT-PCR. Já no estudo promovido por Boonla e colaboradores (2014), verificou-se que em aortas de animais tratados com curcumina na dose de 50 mg/kg/dia apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de MMP-9 quando comparados ao grupo hipertenso sem tratamento, o que também corrobora nosso estudo.

As atividades das MMPs são reguladas por dois principais inibidores endógenos, a α 2-macroglobulina e os TIMPs, sendo que o TIMP-2 possui alta ou baixa expressão renal de acordo com a espécie (NAGASE, VISSÉ, MURPHY, 2006; PARRISH, 2017). Neste contexto, é possível perceber que em nosso estudo não houve diferenças estatísticas significativas entre os 5 grupos experimentais. Estes resultados se assemelham ao estudo feito por Ceron e colaboradores (2012), em que utilizando-se o modelo de hipertensão 2-rins-1-clipe e a técnica de zimografia nas aortas dos animais, verificou-se que em um período de 10 semanas não houve

alterações na expressão de TIMP-2 quando comparou-se o grupo hipertenso com o grupo controle. Em um outro estudo feito por Castro e colaboradores (2009), demonstrou-se que utilizando a técnica de zimografia para as aortas de animais hipertensos induzidos pelo modelo 2-rins-1-clipe, não houve diferenças significativas quando comparados ao grupo controle e, ao utilizar antioxidantes específicos em animais hipertensos (tempol e apocinina), ambos também não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados ao grupo hipertenso sem tratamento, o que corrobora nossos resultados.

Considerando o contexto de inflamação, percebe-se que os macrófagos são essenciais na homeostase tissular e respostas imunes tanto nos rins saudáveis quanto nos que apresentam doenças (GUITERAS; FLAQUER; CRUZADO, 2016). Sua infiltração está relacionada ao desenvolvimento de doença renal crônica, causando diversas respostas de ativação como fagocitose e a produção de citocinas pró-inflamatórias e metabólitos tóxicos, além de que há uma possível relação entre a severidade do dano renal ao grau de infiltração de macrófagos (GUITERAS; FLAQUER; CRUZADO, 2016). No presente estudo, observou-se que o grupo LV apresentou um aumento significativo de marcações para macrófagos CD68 quando comparado ao grupo CV. Esses resultados se assemelham ao estudo promovido por Ozkurt e colaboradores (2018), em que ratas fêmeas receberam L-NAME (20 mg/kg/dia) por 30 dias, e observou-se que houve um aumento significativo no número de marcações para macrófagos. Além disso, no estudo de Polichnowski, Lu e Cowley Jr. (2011) determinou-se que ao induzir à hipertensão ratos machos *Sprague-Dawley* utilizando a combinação de ANG II (5 ng/kg/min) e L-NAME (1,4 µg/kg/min) de maneira intravenosa por um período de 14 dias, houve um aumento significativo nas marcações para macrófagos CD68 nos animais hipertensos quando comparados ao grupo controle. Ainda em nosso estudo, o tratamento dos animais hipertensos com curcumina levou a uma diminuição significativa de marcações para macrófagos CD68 quando comparados ao grupo LV, sugerindo que neste modelo de indução à hipertensão ambas as doses de curcumina podem promover a diminuição de infiltração de macrófagos e, consequentemente, contribuir para a prevenção do desenvolvimento da inflamação.

Além da inflamação, o aumento da pressão arterial sistêmica e o desenvolvimento de danos vasculares podem comprometer as respostas autorregulatórias renais, causando alterações histológicas que podem levar ao desenvolvimento de nefrosclerose e, consequentemente, à doença renal crônica (BIDANI; GRIFFIN, 2004). Os danos renais provenientes da hipertensão são divididos de acordo com a gravidade da doença, sendo o primeiro estágio a nefrosclerose benigna, na qual lesões vasculares não-específicas de arteriosclerose são desenvolvidas sem a presença de proteinúria, além de que a nefrosclerose

é inicial e não leva a um comprometimento sério do funcionamento renal; e o segundo estágio e a nefroesclerose maligna, na qual há o desenvolvimento de arterioesclerose hiperplásica e necrose fibrinoide de arteríolas e glomérulos, levando à proteinúria e perda de função (BIDANI; GRIFFIN, 2004; JAIN, 2013). Em nosso estudo é possível observar um resultado bastante curioso: a indução à hipertensão não levou a uma diminuição do número de glomérulos quando comparado ao grupo controle ($p > 0,05$), entretanto, o tratamento com curcumina em ambas as doses demonstrou um número significativamente maior tanto no grupo CC quando comparado ao grupo CV ($p < 0,05$), quanto nos grupos LC100 e LC50 quando comparados ao grupo LV ($p < 0,05$). No estudo feito por Pereira e Mandarim-de-Lacerda (2001), ratos *Wistar* receberam por 40 dias L-NAME na dose de 50 mg/kg/dia para a indução à hipertensão, e verificou-se que após este período, os animais hipertensos apresentaram uma diminuição significativa no número de glomérulos por área quando comparados ao grupo controle, o que se diferencia do nosso estudo. Em um outro estudo promovido por Abdollahifar e colaboradores (2020), verificou-se que utilizando um modelo de indução à toxicidade renal por bussulfan em ratos *Wistar*, e de maneira concomitante recebendo curcumina por gavagem na dose de 80 mg/kg/dia em um período de por 30 dias, houve uma diminuição no número de glomérulos no grupo que apenas recebeu bussulfan, e o grupo que recebeu curcumina além do bussulfan apresentou um aumento significativo no número de glomérulos quando comparado ao grupo que apenas recebeu bussulfan, demonstrando que a curcumina preveniu a diminuição no número de glomérulos, como em nosso estudo. É importante salientar que nosso estudo foi feito por um curto período de tempo, enquanto que os estudos feitos na literatura são todos mais longos, e que um estudo mais longo poderia demonstrar danos maiores nos glomérulos dos animais hipertensos. Além disso, em nosso estudo os animais hipertensos não apresentaram uma diminuição no número de glomérulos, e que o uso de curcumina, tanto no grupo controle (CC) quanto nos grupos hipertensos (LC100 e LC50) apresentou um número maior de glomérulos, o que pode sugerir que a curcumina é capaz de prevenir possíveis danos aos glomérulos, sejam devido à idade (uma vez que há mudanças nas funções renais conforme os animais vão envelhecendo) ou mesmo devido à hipertensão (MEDEIROS; AQUILA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2006).

8 CONCLUSÃO

Nosso trabalho sugere que o aumento da pressão arterial, dos níveis das atividades das MMPs renais, e da expressão de ED1 através da indução pelo L-NAME participam do dano renal observado em nosso modelo experimental. O tratamento com curcumina foi capaz de atenuar a hipertensão em ambas as doses estudadas, aumentou a atividade antioxidante renal, atenuou a expressão das enzimas MMP-9 e a atividade da MMP-2 nos animais hipertensos, sem alterar os níveis de seu inibidor TIMP-2, diminuiu a expressão de ED1 e preveniu danos glomerulares, com consequente melhora da função renal destes animais em um período de 14 dias.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, R. F. *et al.* Antihypertensive Effects of Roselle-Olive Combination in L-NAME-Induced Hypertensive Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Cairo, PMID 9460653, p. 1-24, 2017.
- ABDOLLAHIFAR, M. *et al.* Protective effect of curcumin on busulfan-induced renal toxicity in male rats. **Renal Failure**, Tehran, v. 42, n. 1, p. 969-977, 2020.
- ADARAMOYE, O. A.; NWOSU, I. O.; FAROMBI, E. O. Sub-acute effect of N G-nitro-l-arginine methyl-ester (L-NAME) on biochemical indices ins rats: Protective effects of Kolaviron and extract of *Curcuma longa* L. **Pharmacognosy Research**, Ibadan, v. 4, n. 3, p. 127-133, 2012.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, [S.l.], v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHMAD, A. *et al.* Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems. **International Journal of Molecular Sciences**, Richmond, v. 19, n. 9, 2018.
- AKINYEMI, A. J. *et al.* Dietary supplementation of ginger and turmeric improves reproductive function in hypertensive male rats. **Toxicology Reports**, Santa Maria, p. 1357-1366, 2015.
- ALI, B. H. *et al.* Some Biological Properties of Curcumin: A Review. **Natural Product Communications**, [Portsmouth], v. 1, n. 6, p. 509-521, 2006.
- ALI, B. H. *et al.* Curcumin Ameliorates Kidney Function and Oxidative Stress in Experimental Chronic Kidney Disease. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Dusseldorf, v. 122, p. 65-73, 2018.
- ALP YILDIRIM, F. *et al.* Barnidipine ameliorates the vascular and renal injury in l-NAME-induced hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, Instambul, v. 764, p. 433-442, 2015.
- ANDRADE, S. S. A. *et al.* Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Epidemiol Serv Saúde**, [S.l.], v. 24, n. 2, p. 297-304, 2015.
- ANDRADE, J. W. S. **Produção e crescimento do açafrão (*Curcuma longa* L.) em função do tamanho do rizoma e densidade do plantio, em Goiás**. 2004. 62f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, 2004.
- ANIMAL RESOURCES CENTRE. **Rat and Mice Weights**. 2021. Disponível em: https://www.arc.wa.gov.au/?page_id=125. Acesso em: 08 ago. 2021.
- ARAUJO, M.; WELCH, W. J. Oxidative stress and nitric oxide in renal function. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, Washington, v. 15, p. 72-77, 2006.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Sevilla, v. 2014, ID 360438, 2014.

- BACHMANN, S.; MUNDEL, P. Nitric Oxide in the Kidney: Synthesis, Localization, and Function. **American Journal of Kidney Diseases**, Heidelberg, v. 24, n. 1, p. 112–129, 1994.
- BARROSO, W. K. S. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.l.], v. 116, n. 3, p. 516-658, 2021.
- BAUDERER, M.; HEDERSTEDT, L. Chapter One - Heme Proteins in Lactic Acid Bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, Lund, v. 62, p. 1-43, 2013.
- BAYLIS, C. et al. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **J. Clin. Invest**, Morgantown, v. 90, p. 278-281, 1992.
- BAYRAK, O. et al. Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. **World Journal of Urology**, Ankara, v. 26, n. 3, p. 285–291, 2008.
- BENJAMIN, M. M.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. **Exs**, Boston, v. 103, p. 209–279, 2012.
- BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Insuficiência Renal Aguda**. 2011. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/insuficiencia-renal-aguda/>. Acesso em: 27 fev. 2023.
- BIDANI, A.; GRIFFIN, K. Pathophysiology of Hypertensive Renal Damage Implications for Therapy. **Hypertension**, Maywood, v. 44, p. 595-601, 2004.
- BOONLA, O. et al. Curcumin improves endothelial dysfunction and vascular remodeling in 2K-1C hypertensive rats by raising nitric oxide availability and reducing oxidative stress. **Nitric Oxide**, London, v. 42, p. 44-53, 2014.
- BOURBOULIA, D.; STLETER-STEVENSON, W. Matrix MetalloProteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion. **Semin Cancer Biol**, Bethesda, v. 20, n. 3, p. 161-168, 2010.
- BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochim Biophys Acta**, Boca Raton, v. 1803, n. 1, p. 55-71, 2010.
- BUFFET, L.; RICCHETTI, C. Chronic Kidney Disease and Hypertension: A Destructive Cobination. **U.S. Pharmacist**, Denver, v. 37, n. 6, p. 26-29, 2012.
- CARDOSO, A. M. et al. Physical training prevents oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats. **Cell Biochemistry and Function**, Santa Maria, v. 31, n. 2, p. 136–151, 2013.
- CASTRO, M. M. et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis**, Ribeirão Preto, v. 198, n. 2, p. 320-331, 2008.
- CASTRO, M. M. et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. **Free Radical Biology and Medicine**, Ribeirão Preto, v. 46, n. 9, p. 1298–1307, 2009.
- CATANIA, J.; CHEN, G.; PARRISH, A. Role of matrix metalloproteinases in renal

patophysiology. **Am J Physiol Renal Physiol**, Texas, v. 292, n. 3, p. F905-F911, 2007.

CERON, C. S. et al. Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. **Br J Pharmacol**, Ribeirão Preto, v. 160, n. 1, p. 77-87, 2010.

CERON, C. S. et al. Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension. **Matrix Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 4, p. 261–270, 2012.

CHENG, Z. et al. MMP-2 and 9 in Chronic Kidney Disease. **Int J Mol Sci**, Nanjing, v. 18, p. 1-11, 2017.

CORREA, F. et al. Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease. **Free Radic Biol Med**, Mexico City, v. 61, p. 119-129, 2013.

COWLEY, A. W. et al. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, Milwaukee, v. 284, n. 6 53-6, 2003.

DABLA, P. K. Renal function in diabetich nephropathy. **World J Diabetes**, New Delhi, v. 1, n. 2, p. 48-56, mai. 2010.

DAMIANO, S. et al. Antioxidative effects of curcumin on the hepatotoxicity induced by ochratoxin a in rats. **Antioxidants**, Naples, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2021.

DIMAS, G.; ILIADIS, F.; GREKAS, D. Matrix metalloproteinases, atherosclerosis, proteinuria and kidney disease: Linkage-based approaches. **Hippokratia**, Thessaloniki, v. 17, n. 4, p. 292–297, 2013.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Belo Horizonte, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EVORA, P. R. B. et al. Relaxamento dependente do endotélio causado pela poli-L-arginina. Implicações sobre a hiperpolarização como mecanismo de vasodilatação. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Ribeirão Preto, v. 80, n. 6, p. 621–630, 2003.

FANUCCHI, V. M. Chapter 11. Development of Antioxidant and Xenobiotic Metabolizing Enzyme Systems. In: HARDING, R.; PINKERTON, K. **The Lung**. USA: Academic Press, 2014. cap. 11, p. 177-185.

FARIA, E. **A cultura do açafrão em mara rosa (GO): Cooperaçãfrão (2003-2011)**. 2012. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável) - Pontfca Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, 2012.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000.

FUJITA, H. et al. Reduction of Renal Superoxide Dismutase in Progressive Diabetic Nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, Akita, v. 20, p. 1303-1313, 2009.

GANDHI, C.; ZALAWADIA, R.; BALARAMAN, R. Nebivolol reduces experimentally

induced warm renal ischemia reperfusion injury in rats. **Renal Failure**, Baroda, v. 30, n. 9, p. 921–930, 2008.

GONZÁLEZ, J. et al. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. **World J Cardiol**, Casilla, v. 6, n. 6, p. 353-366, 2014.

GREISH, S. M. et al. Protective potential of curcumin in L-NAME-induced hypertensive rat model : AT1R , mitochondrial DNA synergy. **International Journal of Pathophysiology and Pharmacology**, [Ismailia], v. 12, n. 5, p. 134–146, 2020.

GUIMARÃES, D. A. et al. Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? **Ver Bras Hipertensão**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 4, p. 226-230, 2010.

GUPTA-MALHOTRA, M. et al. Essential hypertension vs. secondary hypertension among children. **American Journal of Hypertension**, Houston, v. 28, n. 1, p. 73–80, 1 jan. 2015.

GUI TERAS, R.; FLAQUER, M.; CRUZADO, J. Macrophage in chronic kidney disease. **Clinical Kidney Journal**, Barcelona, v. 9, n. 6, p. 765–771, 2016.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants : Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Hertfordshire, v. 393, n. 4, p. 561–564, 2010.

GWOZDZ, T.; DOREY, K. **Basic Science Methods for Clinical Researchers**. United Kingdom: Academic Press, 2017.

HAFEZ, M. H.; ABDELLATIF, D. A.; ELKHATIB M. M. Prevention of Renal Disease Progression and Renal Replacement Therapy in Emerging Countries. **Artif Organs**, [S.I], v. 30, n. 7, p. 501-509, 2006.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, London, v. 344, n. 8924, p. 721–724, 1994.

HERRMANN, S. M.; TEXTOR, S. C. Renovascular Hypertension. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Rochester, v. 48, n. 4, p. 765-778, 2019.

HOLTERMAN, C. E.; READ, N. C.; KENNEDY, C. R. Nox and renal disease. **Clinical Science**, Ottawa, v. 128, p. 465-481, 2015.

HU, J. et al. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nat Rev Drug Discov**, Leuven, v. 6, n. 6, p. 480-498, jun. 2007.

HU, J. et al. Curcumin modulates covalent histone modification and TIMP1 gene activation to protect against vascular injury in a hypertension rat model. **Exp Ther Med**, Shanghai, v. 14, n. 6, p. 5896-5902, 2017.

JÄGER, R. et al. Comparative absorption of curcumin formulations. **Nutrition Journal**, Milwaukee, v. 13, n. 11, 2014.

JAIN, M. Hypertensive renal disease: Histological aspects. **Clinical Queries: Nephrology**, Lucknow, v. 2, p. 23-28, 2013.

JAKUBCZYK, K et al. Antioxidant potential of curcumin—A meta-analysis of randomized clinical trials. **Antioxidants**, Szczecin, v. 9, n. 11, p. 1092, 2020.

- JANISZEWSKI, M. et al. Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. **Free Radic Biol Med**, São Paulo, v. 32, n.5, p. 446-453, 2002.
- JAN-ON, G. et al. Virgin rice bran oil alleviates hypertension through the upregulation of eNOS and reduction of oxidative stress and inflammation in L-NAME-induced hypertensive rats. **Nutrition**, Khon Kaen, v. 69, p. 110575, 2020.
- JHA, J. C. et al. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signalling**, Melbourne, v. 25, n. 12, p. 657-684, 2016.
- KANDASAMY, A. D. et al. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: Beyond the matrix. **Cardiovascular Research**, Edmonton, v. 85, n. 3, p. 413-423, 2010.
- KLEINER, D.; STLETER-STEVENSON, W. Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 218, p. 325-329, 1994.
- KOBUSIAK-PROKOPOWICZ, M. et al. MMP-2 and TIMP-2 in patients with heart failure and chronic kidney disease. **Open Medicine (Poland)**, Wrocław, v. 13, n. 1, p. 237-246, 2018.
- KUKONGVIRIYAPAN, U. et al. Curcumin protects against cadmium-induced vascular dysfunction, hypertension and tissue cadmium accumulation in mice. **Nutrients**, Bangkok, v. 6, n. 3, p. 1194-1208, 2014.
- KURZEPA, J. et al. Collagenases and gelatinases in bone healing. The focus on mandibular fractures. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences**, Lublin, v. 27, n. 2, p. 121-126, 2014a.
- KURZEPA, J. et al. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. **International Journal of Neuroscience**, Lublin, v. 124, n. 10, p. 707-716, 2014b.
- LANDMESSER, U. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **Journal of Clinical Investigation**, Atlanta, v. 111, n. 8, p. 1201-1209, 2003.
- LARONHA, H.; CALDEIRA, J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. **Cell**, Caparica, v. 9, n. 5, p. 1076, 2020.
- LEI, X. G. et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: Basic mechanisms and health implications. **Physiological Reviews**, [S.l.], v. 96, n. 1, p. 307-364, 2015.
- LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia plena**, Sergipe, v. 10, n. 3, p. 1-9, 2014.
- LINARDI, A. et al. Peptidase activities in rats treated chronically with *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). **Biochemical Pharmacology**, Campinas, v. 68, p. 205-214, 2004.
- MAHMOUD, M. F.; ZAKARIA, S.; FAHMY, A. Can Chronic Nitric Oxide Inhibition Improve Liver and Renal Dysfunction in Bile Duct Ligated Rats? **Adv Pharmacol Sci**, Zagazig, v. 2015, ID 298792, 2015.

- MAJID, D. S. A.; NAVAR, L. G. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. **American Journal of Hypertension**, New Orleans, v. 14, n. 6 II, p. 74–82, 2001.
- MAJZUNOVA, M. et al. Chronic NOS Inhibition Affects Oxidative State and Antioxidant Response Differently in the Kidneys of Young Normotensive and Hypertensive Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Bratislava, v. 2019, 2019.
- MALLE, E.; BUCH, T.; GRONE, H. Myeloperoxidase in kidney disease. **Kidney International**, Graz, v. 64, n. 6, p. 1956–1967, 2003.
- MARTINEZ, M. L. et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats. **Eur J Pharmacol**, Ribeirão Preto, v. 591, n. 1-3, p. 224-230, set. 2008.
- MAYO CLINIC. **High blood pressure dangers: Hypertension’s effects on your body**. 2019. Disponível em: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/high-blood-pressure/in-depth/high-blood-pressure/art-20045868>. Acesso em: 07 jun. 2019.
- MEDEIROS, F.; AGUILA, M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. Renal cortex remodeling in streptozotocin-induced diabetic spontaneously hypertensive rats treated with olive oil, palm oil and fish oil from Menhaden. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Rio de Janeiro, v. 75, p. 357-365, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hipertensão é diagnosticada em 24,7% da população, segundo a pesquisa Vigitel**. Disponível em <https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45446-no-brasil-388-pessoas-morrem-por-dia-por-hipertensao>. Acesso em: 08 jul. 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hipertensão arterial: hábitos saudáveis ajudam na prevenção e no controle da doença**. 2021. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/noticia/12076>. Acesso em: 01 ago. 2021.
- MOGHADAMTOUSI, S. et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed Research International**, [Bushehr], v. 2014, 2014.
- MONINGKA, N. et al. Protective actions of nebivolol on chronic nitric oxide synthase inhibition-induced hypertension and chronic kidney disease in the rat: A comparison with angiotensin II receptor blockade. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Gainesville, v. 27, n. 3, p. 913–920, 2012.
- MOUNT, P. F.; POWER, D. A. Nitric oxide in the kidney: Functions and regulation of synthesis. **Acta Physiologica**, Victoria, v. 187, n. 4, p. 433–446, 2006.
- MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Mol Aspects Med**, Cambridge, v. 29, n. 5, p. 290-308, out. 2008.
- NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, London, v. 69, n. 3, p. 562–573, 2006.
- NAKMAREONG, S. et al. Antioxidant and vascular protective effects of curcumin and tetrahydrocurcumin in rats with L-NAME-induced hypertension. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, Khon Kaen, v. 383, n. 5, p. 519-529, 2011.

NEWBY, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiovasc Res**, Bristol, v. 69, n.3, p. 614-624, fev. 2006.

ÖKTEM, F. et al. Lisinopril attenuates renal oxidative injury in L-NAME-induced hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Instambul, v. 352, n. 1–2, p. 247–253, 2011.

OLIVER, E. et al. Changes in Adrenoceptors and G-protein-Coupled Receptor Kinase 2 in L-NAME-Induced Hypertension Compared to Spontaneous Hypertension in Rats. **J Vasc Res**, Valencia, v. 51, p. 209-220, 2014.

OZKURT, M. et al. Erythropoietin Protects the Kidney by Regulating the Effect of TNF- α in L-NAME-Induced Hypertensive Rats. **Kidney and Blood Pressure Research**, Eskisehir, v. 43, n. 3, p. 807–819, 2018.

PARRISH, A. R. **Matrix Metalloproteinases in Kidney Disease: Role in Pathogenesis and Potential as a Therapeutic Target**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 148

PAWLAK, K.; PAWLAK, D.; MYSLIWIEC, M. Cu/Zn superoxide dismutase plasma levels as a new useful clinical biomarker of oxidative stress in patients with end-stage renal disease. **Clinical Biochemistry**, Bialystok, v. 38, n. 8, p. 700–705, 2005.

PEREIRA, L.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. Glomerular profile numerical density per area and mean glomerular volume in rats submitted to nitric oxide synthase blockade. **Histol Histopathol**, Rio de Janeiro, v. 16, p. 15-20, 2001.

POLICHNOWSKI, A.; LU, L.; COWLEY, A. Renal injury in angiotensin II+L-NAME-induced hypertensive rats is independent of elevated blood pressure. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Milwaukee, v. 300, n. 4, p. 1008–1016, 2011.

PICCOLI, G. B. et al. Pregnancy in chronic kidney disease: need for a common language. **J Nephrol**, Orbassano, v. 24, n. 3, p. 282-299, 2011.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Bucharest, v. 97, p. 55-74, abr. 2015.

PRADO, A. F. et al. Matrix metalloproteinases and arterial hypertension: Role of oxidative stress and nitric oxide in vascular functional and structural alterations. **Biomolecules**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, 2021.

QUINTERO-FABIÁN, S. et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. **Frontiers in Oncology**, Mexico City, v. 9, p. 1–21, 2019.

RIBEIRO, M. O. et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension**, São Paulo, v. 20, p. 298–303, 1992.

RIZZI, E. et al. Nitrite treatment downregulates vascular MMP-2 activity and inhibits vascular remodeling in hypertension independently of its antihypertensive effects. **Free Radic Biol Med**, Ribeirão Preto, v. 130, p. 234-243, 2019.

RODIÑO-JANEIRO, B. K. et al. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. **Vascular health and risk management**, Santiago de Compostela, v. 9, n. 1, p. 401–428, 2013.

- RODRIGO, R.; RIVERA, G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. **Free Radic Biol Med**, Santiago, v. 33, n. 3, p. 409-422, 2002.
- RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, E. et al. Association between renal dysfunction and metalloproteinase (MMP)-9 activity in hypertensive patients. **Nefrologia**, Madrid, v. 39, n. 2, p. 184-191, 2019.
- SANGARTIT, W. et al. Tetrahydrocurcumin protects against cadmium-induced hypertension, raised arterial stiffness and vascular remodeling in mice. **PLoS ONE**, Khon Kaen, v. 9, n. 12, p. 1–21, 2014.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signalling and Oxidative Stress. **Current Biology**, Chicago, v. 24, p. 453-462, 2014.
- SCHULZ, E.; GORI, T.; MÜNDEL, T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. **Hypertension Research**, Mainz, v. 34, n. 6, p. 665–673, 2011.
- SIMPLICIO, J. A. et al. Contribution of oxidative stress and prostanoids in endothelial dysfunction induced by chronic fluoxetine treatment. **Vac Pharmacol**, Ribeirão Preto, v. 73, p. 124-137, 2015.
- SUNG, C. et al. Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/301982/>. Acesso em: 07 jun. 2019.
- TABET, F.; TOUYZ, R. M. Chapter 30 – Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress, and Vascular Biology in Hypertension. In: GREGORY, Y. H.; JOHN, E. H. **Comprehensive Hypertension**. Mississipi: Mosby, 2007. cap. 30. p. 337-347.
- TALAS, Z. S. et al. Role of propolis on biochemical parameters in kidney and heart tissues against l-NAME induced oxidative injury in rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, Nigde, v. 36, n. 7, p. 492–496, 2014.
- TAPIA, E. et al. Curcumin reverses glomerular hemodynamic alterations and oxidant stress in 5/6 nephrectomized rats. **Phytomedicine**, Mexico City, v. 20, p. 359-366, 2013.
- TAPIA, E. et al. Curcumin Induces Nrf2 Nuclear Translocation and Prevents Glomerular Hypertension, Hyperfiltration, Oxidant Stress, and the Decrease in Antioxidant Enzymes in 5/6 Nephrectomized Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Mexico City, PMID 269039, P.1-14, 2012.
- THRAIKILL, M. K.; BUNN, C. R.; FOWLKES; L. J. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Endocrine**, Little Rock, v. 35, n. 1, p. 1-10, fev. 2009.
- TEIXEIRA, M. G. D. et al. As propriedades biológicas da curcumina: uma revisão de literatura. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, Cascavel, v. 3, n. 3, 2022.
- VAREED, S. K. et al. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. **American Association for Cancer Research**, Ann Arbor, v. 17, n. 6, p. 1411–1417, 2008.

WAN, R. et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by metal nanoparticles in human monocytes: The role of oxidative stress and protein tyrosine kinase activation. **Toxicol Appl Pharmacol**, Louisville, v. 233, n. 2, p. 276-285, 2008.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, Homburg, v. 44, n. 4, p. 381-386, 2004.

WILKEN, R. et al. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. **Molecular Cancer**, Los Angeles, v. 10, n. 1, p. 1-19, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hypertension**. 2021. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension#>. Acesso em: 19 dez. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. 2021. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em: 01 ago. 2021.

WU, J. et al. Effect of curcumin on glycerol-induced acute kidney injury in rats. **Scientific Reports**, Nanjing, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

XU, X. et al. A Glimpse of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Nephropathy. **Curr Med Chem**, Changsha, v. 21, n. 28, p. 3244-3260, dez. 2014.

YANG, Y. L. et al. Endothelin and gelatinases in renal changes following blockade of nitric oxide synthase in hypertensive rats. **Chinese Journal of Physiology**, Chiayi City, v. 51, n. 3, p. 186-195, 2008.

ZAKIYANOV, O. et al. Matrix metalloproteinases in renal diseases: A critical appraisal. **Kidney and Blood Pressure Research**, Prague, v. 44, n. 3, p. 298-330, 2019.

ZATS, R.; BAYLIS, C. Chronic nitric oxide inhibition model: six years on. **Hypertension**, São Paulo, v. 32, p. 958-964, 1998.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.




CEUA
Comissão de Ética
no Uso de Animais

Ribeirão Preto, 16 de março de 2018.

Prezado(a) Pesquisador (a) Dr^a Ellen Rizzi Sanchez

Vimos por meio desta, informar que a proposta intitulada “EFEITOS DA CURCUMINA E CURCUMINOIDES CH5 SOBRE AS ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS CARDIOVASCULARES, ESTRESSE OXIDATIVO E AUMENTO DA METALOPROTEÍNASE DA MATRIZ EXTRACELULAR (MMP)-2 DECORRENTES DA HIPERTENSÃO ARTERIAL”, registrada sob o nº 13/2017”, e sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) Dr^a Ellen Rizzi Sanchez, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa 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 aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA UNAERP, em reunião realizada em 28/02/2018.

Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.


Prof.^a Dr.^a Luciana Rezende Alves Oliveira

**Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Ribeirão Preto**

Finalidade: <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Vigência da Autorização: a partir de 28/02/2017
Espécie / Linhagem / Raça: Ratos Wistar Norvegicus
Nº de Animais: 200
Peso / Idade: 200g/35 dias
Sexo: M
Origem: Biotério da Unaerp

Av: Costabile Romano, 2201 – Bairro Ribeirânia – Ribeirão Preto-SP - CEP. 14096-900
Fone: (16) 3603-6895 e-mail cetica@unaerp.br