UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ENZO RICARDO RUSSO

Avaliação do uso oral da droga vegetal de *Curcuma longa* L. no tratamento da nefropatia induzida por doxorrubicina em um modelo animal

Ribeirão Preto
2017

ENZO RICARDO RUSSO

Avaliação do uso oral da droga vegetal de *Curcuma longa* L. no tratamento da nefropatia induzida por doxorubicina em um modelo animal

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente - Investigação em Pediatria.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Carmona

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Russo, Enzo Ricardo

Avaliação do uso oral da droga vegetal de *Curcuma longa* L. no tratamento da nefropatia induzida por doxorubicina em um modelo animal. Ribeirão Preto, 2017.

107 p.: il. 30cm

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Carmona, Fabio

1. <i>Curcuma longa</i> L.	2. Síndrome Nefrótica
3. Fitoterapia	4. Doxorubicina
5. Inflamação	6. Modelo Animal

Nome: Enzo Ricardo Russo

Título: **Avaliação do uso oral da droga vegetal de *Curcuma longa* L. no tratamento da nefropatia induzida por doxorubicina em um modelo animal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fabio Carmona

Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha esposa Márcia, presente de forma incondicional em todos os momentos, um exemplo de dedicação e companheirismo.

Ao meu filho Enzo, razão do meu viver, pela compreensão.

Aos meus pais Vincenzo e Marcia, pelo amor, valores e caráter que me transmitiram.

Aos meus irmãos Leandro e Danilo, pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço por essa vitória, sem Teu apoio, jamais a teria alcançado.

Ao Prof. Dr. Fabio Carmona, orientador deste estudo, pela oportunidade de sua realização, pela paciência, profissionalismo e dedicação em todos os momentos dessa jornada. Meu sincero agradecimento.

A Profa. Dra. Inalda Facincani, meu maior exemplo de dedicação profissional às crianças, pelo apoio incondicional a realização deste sonho. Meu eterno reconhecimento e gratidão.

A Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra, pelas orientações, ensinamentos e pela oportunidade de realização deste trabalho no laboratório de fisiologia renal da FMRP-USP.

Ao Prof. Dr. Roberto Costa pela disponibilização do laboratório de patologia renal da FMRP-USP.

Ao Prof. Dr. Eduardo Coelho, pelo empréstimo dos equipamentos do laboratório de hipertensão experimental e farmacogenética da FMRP-USP.

A Profa. Dra. Silvana L. Górnaiak, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pela oportunidade de utilizar o CEPTOX no *campus* de Pirassununga.

A minha família da nefrologia pediátrica do HCRP, de onde muitas vezes tive que me ausentar para a realização deste projeto, meu muito obrigado.

A todos os colegas do laboratório de fisiologia renal Cleonice Silva, Heloísa Francescato e Lucas de Almeida por todo o apoio prestado na realização deste projeto.

Ao colega Paulo Cesar Fabrício Raspantini, encarregado do CEPTOX, pelo apoio na manipulação e preparo da ração dos animais.

A Andreia Leone, do laboratório de hipertensão experimental e farmacogenética da FMRP, pelo apoio nas dosagens bioquímicas.

Aos técnicos da patologia renal Flávio Henrique Leite e Guilherme de Paula Lemos pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas.

Aos técnicos do biotério, pelo apoio e cuidado com os animais.

Aos professores do programa de pós-graduação do departamento de puericultura e pediatria.

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), pela oportunidade de realização deste trabalho.

RESUMO

RUSSO, Enzo Ricardo. **Avaliação do uso oral da droga vegetal de *Curcuma longa* L. no tratamento da nefropatia induzida por doxorrubicina em um modelo animal.** 2017.

107f. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2017.

Introdução: A curcumina é um polifenol presente no rizoma da espécie *Curcuma longa* L. que tem sido usado há séculos como medicamento anti-inflamatório na medicina asiática. A síndrome nefrótica é classicamente tratada com corticosteroides, uma potente classe anti-inflamatória e imunossupressora. O tratamento pode trazer sérios efeitos adversos.

Objetivos: Este estudo foi desenhado para avaliar o efeito anti-inflamatório e anti-proteinúrico da *C. longa* na forma de droga vegetal, na lesão renal induzida pela doxorrubicina. **Desenho do estudo:** Trata-se de um estudo experimental *in vivo*. **Métodos:** O efeito anti-inflamatório e anti-proteinúrico da *C. longa* foi avaliado utilizando-se 4 grupos de ratos Wistar: dois grupos com lesão renal induzida por doxorrubicina (3,5 mg/kg) em dose única endovenosa, sendo um alimentando-se de ração padrão e outro com ração misturada a *C. longa* (5 mg/g de ração). Outros dois grupos controles sem lesão renal foram alimentados, sendo um com ração padrão e outro com *C. longa*. Foram coletadas amostras de urina para dosagem de albuminúria a cada 2 semanas. Após 8 semanas os animais foram anestesiados e coletado sangue para dosagem no plasma de creatinina, albumina, sódio, potássio, colesterol e osmolalidade. Nas amostras de urina foram dosados albuminúria, sódio, potássio, osmolalidade e os mediadores inflamatórios proteína quimiotática para monócitos-1 e fator de transformação do crescimento beta urinário. Foi coletado tecido renal para realização de microscopia de luz e de imuno-histoquímica para desmina, vimentina e células ED-1 positivas. **Resultados:** Após a 8ª semana de acompanhamento, o tratamento com *C. longa* atenuou o aumento do MCP-1 urinário, do TGF- β urinário, da imunomarcagem para desmina, vimentina e células ED-1⁺ nos ratos com lesão renal induzida. **Conclusão:** Os resultados sugerem que o uso de *C. longa* em um modelo experimental de lesão renal por doxorrubicina, por 8 semanas, não reduz a albuminúria, mas leva a diminuição dos mediadores inflamatórios renais MCP-1 e TGF- β urinário, além de imunomarcagem para desmina, vimentina e células ED-1⁺ no tecido renal.

Palavras-chave: *Curcuma longa* L., Síndrome nefrótica, Fitoterapia, Doxorrubicina, Inflamação, Modelo animal.

ABSTRACT

RUSSO, Enzo Ricardo. **Evaluation of oral powdered dried rhizomes of *Curcuma longa* L. in the treatment of doxorubicin-induced kidney injury in an animal model.** 2017. 107f. Tese (Doutorado) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2017.

Background: Curcumin is a polyphenol present in the rhizome of the species *Curcuma longa* L., which has been used for centuries as an anti-inflammatory remedy in Asian medicine. Nephrotic syndrome is classically treated with corticosteroids, a potent anti-inflammatory and immunosuppressive class. The treatment can cause serious adverse effects. **Objectives:** This study was designed to evaluate the anti-inflammatory and anti-proteinuric effects of *C. longa*, as powdered dried rhizomes, in renal injury induced by doxorubicin. **Study design:** This is an *in vivo* experimental study. **Methods:** The anti-inflammatory and anti-proteinuric effects of *C. longa* were evaluated in four groups of Wistar rats: two groups with intravenous doxorubicin-induced kidney injury (3.5 mg/kg), one fed with standard food and another with standard food mixed with *C. longa* (5 mg/g food). Two other control groups without kidney injury were fed, one with standard and one with *C. longa*-mixed food. Urine samples were collected for albuminuria every 2 weeks. After 8 weeks, the animals were anesthetized and blood was collected for measurement of plasma creatinine, albumin, sodium, potassium, cholesterol and osmolality. In the urine samples, measurements of albuminuria, sodium, potassium, osmolality and inflammatory mediators as monocyte chemoattractant protein-1 and transforming growth factor beta were done. Renal tissue was collected for light microscopy and immunohistochemistry for desmin, vimentin and ED-1 positive cells. **Results:** After the 8th week of follow-up, treatment with *C. longa* attenuated the increase of urinary MCP-1, urinary TGF- β , and immunostaining for desmin, vimentin and ED-1⁺ cells in rats with doxorubicin-induced kidney injury. **Conclusion:** The results suggest that the use of *C. longa* in an experimental model of nephrotic syndrome for 8 weeks does not reduce albuminuria, but there is a decrease in the inflammatory mediators urinary MCP-1, urinary TGF- β , and immunostaining for desmin, vimentin and ED-1⁺ cells.

Keywords: *Curcuma longa* L., Nephrotic syndrome, Herbal medicine, Doxorubicin, Inflammation, Animal model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Curcuma longa</i> L.: raiz conhecida como “açafrão-da-terra”	25
Figura 2 - Variação do peso dos animais	43
Figura 3 - Variação da ingesta de ração	43
Figura 4 - Variação da ingesta de droga vegetal de <i>Curcuma longa</i>	44
Figura 5 - Variação do volume urinário	45
Figura 6 - Relação entre albumina e creatinina urinária (a) e albuminúria de 24h (b), com o respectivo erro padrão da média.....	46
Figura 7 - Albumina sérica da amostra coletada no D56 do estudo.....	47
Figura 8 - Colesterol sérico da amostra coletada no D56 do estudo	48
Figura 9 - Creatinina sérica da amostra coletada no D56 do estudo	49
Figura 10 - Sódio sérico da amostra coletada no D56 do estudo	50
Figura 11 - Potássio sérico da amostra coletada no D56 do estudo.....	51
Figura 12 - Fração de excreção de sódio (FeNa) coletado no D56 do estudo.....	52
Figura 13 - Fração de excreção de potássio (FeK) coletado no D56 do estudo	52
Figura 14 - Osmolalidade sérica de amostra de sangue coletado no D56 do estudo	53
Figura 15 - Osmolalidade urinária de amostra coletada no D56 do estudo	54
Figura 16 - Relação entre a proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1) e a creatinina da amostra urinária coletada no D56 do estudo.....	55
Figura 17 - Relação entre o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e a creatinina da amostra urinária coletada no D56 do estudo.....	56
Figura 18 - Cortes histológicos corados com Tricrômio de Masson de córtex renal	57
Figura 19 - Escore para avaliação de lesão glomerular de córtex renal corado por Tricrômio de Masson.....	59
Figura 20 - Escore para avaliação de lesão túbulo-intersticial de córtex renal corado por Tricrômio de Masson	60
Figura 21 - Cortes histológicos com imunomarcção para desmina.....	61
Figura 22 - Escore de imunomarcção para desmina no compartimento glomerular do córtex renal	62
Figura 23 - Cortes histológicos com imunomarcção para vimentina.....	63
Figura 24 - Escore de imunomarcção para vimentina no compartimento túbulo-intersticial do córtex renal	64

Figura 25 - Cortes histológicos com imunomarcacão para células ED-1 ⁺	65
Figura 26 - Número de células ED-1 ⁺ por glomérulo.....	66
Figura 27 - Número de células ED-1 ⁺ na região túbulo-intersticial por campo de 0,245mm ²	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de curcuminoides em amostras de <i>C. longa</i> analisadas por HPLC em (mg/g) de peso seco.....	42
Tabela 2 - Ingesta de ração em gramas por dia (g/dia) e ingesta de droga vegetal em miligramas por quilograma por dia (mg/kg/dia).....	44
Tabela 3 - Relação entre albumina e creatinina urinária e albuminúria de 24 horas	45
Tabela 4 - Relação entre MCP-1/creatinina urinária.....	54
Tabela 5 - Relação entre TGF- β /creatinina urinária	56
Tabela 6 - Escores de lesão glomerular e lesão túbulo-intersticial de córtex renal corado por Tricrômio de Masson	58
Tabela 7 - Escore de imunomarcacão para desmina no compartimento glomerular do córtex renal	61
Tabela 8 - Escore de imunomarcacão para vimentina no compartimento túbulo-intersticial do córtex renal	63
Tabela 9 - Número de células ED-1 ⁺ no compartimento glomerular e túbulo-intersticial do córtex renal	65

LISTA DE SIGLAS

Alb24h	Albuminúria de 24 horas
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CUR	<i>Curcuma longa</i> L.
D0	Dia do início do estudo
D14	14º dia do estudo
D28	28º dia do estudo
D42	42º dia do estudo
D56	56º dia do estudo
DAB	3,3 Diaminobenzidina
DF	Diafragma de fenda
DOX	Cloridrato de doxorrubicina
DOX-CUR	Grupo induzido com doxorrubicina e tratado com ração contendo <i>Curcuma longa</i> L.
DOX-PAD	Grupo induzido com doxorrubicina e tratado com ração padrão
DRC	Doença renal crônica
ED-1 ⁺	Células ED-1 positivas
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GESF	Glomeruloesclerose segmentar e focal
GNLM	Glomerulonefrite por lesões mínimas
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
IgG	Anti-imunoglobulina G
IL	Interleucina
IH	Imuno-histoquímica
IKK- α	Quinase inibidora do fator nuclear NF- κ B alfa
I- κ Ba	Proteína inibitória κ Ba
LGM	Lesão glomerular mínima
MBG	Membrana basal glomerular
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos e macrófagos-1
Methacarn	Solução de methanol-Carnoy
MEC	Matriz extracelular

ML	Microscopia de luz
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> -B
PAD	Ração padrão
PBS	Phosphate-buffered saline
PMD	Proliferação mesangial e difusa
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
RAC	Relação entre a albumina e creatinina urinária
RI	Rizoma intacto
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RP	Rizoma em pó
SAL	Solução salina isotônica 0,9%
SAL-CUR	Grupo induzido com solução salina e tratado com ração contendo <i>Curcuma longa</i> L.
SAL-PAD	Grupo induzido com solução salina e tratado com ração padrão
SN	Síndrome nefrótica
SNCR	Síndrome nefrótica cortico-resistente
SNCS	Síndrome Nefrótica cortico-sensível
SNI	Síndrome nefrótica idiopática
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta (transforming growth factor beta)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UNAERP	Universidade de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
d	Dia
dL	Decilitro
g	Grama
g/dia	Grama por dia
h	Hora
K	Potássio
kg	Quilograma
L	Litro
Log	Logaritmo na base 10
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm ²	Milímetro quadrado
mmHg	Milímetro de mercúrio
mOsm	Miliosmol
m ²	Metro quadrado
n	Número
Na	Sódio
pg	Picograma
Rpm	Rotação por minuto
vs	Versus
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Síndrome Nefrótica.....	18
1.2	Fisiopatologia	18
1.3	Modelo Animal.....	21
1.4	Fitoterápicos	23
1.5	<i>Curcuma longa</i> L. (“açafrão-da-terra”, Zingiberaceae).....	24
2	OBJETIVO GERAL	30
2.1	Objetivos específicos.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Material.....	32
3.1.1	Preparo da droga vegetal	32
3.1.2	Quantificação dos curcuminoides	32
3.1.3	Dose da droga vegetal.....	33
3.1.4	Preparo da Ração.....	34
3.1.5	Caracterização da Amostra Animal	34
3.1.6	Ambiente dos Experimentos	34
3.1.7	Modelo experimental de SN induzido por DOX	35
3.2	Delineamento experimental.....	35
3.2.1	Distribuição dos grupos	35
3.3	Determinação dos níveis séricos e urinários.....	36
3.4	Análise histológica.....	37
3.4.1	Microscopia de luz	38
3.4.2	Imuno-histoquímica.....	38
3.5	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Quantificação de curcuminoides na droga vegetal.....	42
4.2	Peso dos animais	42
4.3	Ingesta de ração por animal	43
4.4	Ingesta da droga vegetal	44
4.5	Volume urinário	45
4.6	Relação albumina e creatinina urinária e albuminúria de 24 horas....	45
4.7	Albumina sérica	46
4.8	Colesterol sérico.....	47

4.9	Creatinina sérica.....	48
4.10	Sódio sérico.....	49
4.11	Potássio sérico	50
4.12	Frações de excreção de sódio (FeNa) e de potássio (FeK).....	51
4.13	Osmolalidade sérica	53
4.14	Osmolalidade urinária.....	53
4.15	MCP-1 urinário/creatinina urinária.....	54
4.16	TGF- β urinário/creatinina urinária.....	55
4.17	Microscopia de luz.....	56
4.18	Desmina	60
4.19	Vimentina.....	62
4.20	Células ED-1 ⁺	64
5	DISCUSSÃO	69
6	REFERÊNCIAS.....	75
7	Anexo I – Certificado de aprovação do Protocolo para Uso de Animais em Experimentação.	83
8	APÊNDICE I – Artigo submetido para publicação	85

Introdução

---

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome Nefrótica

A síndrome nefrótica (SN) é um conjunto de sinais e sintomas caracterizado por proteinúria, hipoalbuminemia e edema. É uma doença definida clinicamente pela presença de proteinúria maciça ($\geq 40 \text{ mg/m}^2/\text{hora}$ ou 50 mg/kg/dia em crianças e $\geq 3,5 \text{ g/dia}$ em adultos) e hipoalbuminemia (albumina sérica $< 2,5 \text{ g/dL}$ em crianças e $< 3,5 \text{ g/dL}$ em adultos), geralmente associadas com edema generalizado e alterações do metabolismo lipídico.

A principal causa de síndrome nefrótica idiopática (SNI) em adultos é a glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF), sendo responsável por 40% dos casos nesta população (D'AGATI; KASKEL; FALK, 2011). Já na população pediátrica a principal causa de SNI é a glomerulonefrite por lesões mínimas (GNLM), podendo ser responsável por 85 a 90% dos casos (HOGAN; RADHAKRISHNAN, 2013). A GNLM é a doença glomerular mais comum na infância. Geralmente tem início entre os 2 e 7 anos de idade com pico de incidência aos 3 anos de idade (EDDY; SYMONS, 2003). Nos Estados Unidos e na Europa, a incidência é de 16 para cada 100.000 crianças abaixo de 16 anos (GIPSON et al., 2009).

O principal tratamento tanto para a GESF primária como para a GNLM é o uso de corticosteroides (D'AGATI; KASKEL; FALK, 2011), cerca de 80% das crianças com GNLM mostram remissão da proteinúria com a utilização da droga (LOMBEL; GIPSON; HODSON, 2013). A maioria dos casos que respondem ao tratamento inicial cursa com várias recidivas e/ou dependência do uso prolongado de corticosteroides para manutenção da doença em remissão, até atingir a cura definitiva. Entretanto, o uso prolongado de corticosteroides pode acarretar efeitos colaterais indesejáveis como a síndrome de Cushing e o comprometimento do crescimento pôndero-estatural. Assim é necessário o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da síndrome nefrótica.

1.2 Fisiopatologia

A proteinúria é uma das principais características das doenças renais e também é um marcador de alterações na barreira de filtração glomerular. A

barreira de filtração glomerular é composta por células endoteliais, membrana basal glomerular (MBG) e o diafragma de fenda (DF), localizado entre os processos podais dos podócitos. Como as fenestrações das células endoteliais têm grande diâmetro, a limitação da passagem de proteínas por esta porção é limitada ao tamanho da molécula. A MBG tem uma superfície rica em cargas aniônicas que funcionam como uma barreira elétrica. Além disto, a MBG é composta por fibras que estão dispostas de maneira entrelaçada. Os podócitos estão localizados na porção mais externa da MBG e estão divididos estruturalmente e funcionalmente em três porções: o corpo, os prolongamentos primários e os prolongamentos secundários (pedicelos). Os podócitos são células em estágio final de diferenciação celular, sem capacidade de regeneração após sofrerem alguma lesão. Eles são a última barreira contra a perda de proteínas. Se os podócitos forem lesados, a proteinúria se desenvolve (KERJASCHKI, 2001). A estrutura dos podócitos depende principalmente da expressão de proteínas do citoesqueleto. Essas proteínas específicas, junto com as proteínas do diafragma de fenda, são porções fundamentais da barreira podocitária e regulam a filtração renal normal.

Alguns estudos demonstram a importância do sistema imunológico no desenvolvimento e na manutenção da SNI. Acredita-se que exista uma desregulação dos genes relacionados ao processo de maturação e diferenciação dos linfócitos T, ocasionando um desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 (ELIE et al., 2012; PEREIRA et al., 2014), além da provável interferência de fatores circulantes (ARAYA et al., 2009; PEREIRA et al., 2014; SHALHOUB, 1974). Apesar dos avanços na compreensão da SN, a fisiopatologia da doença ainda não é completamente conhecida (EDDY; SYMONS, 2003; ELIE et al., 2012; HODSON; ALEXANDER, 2008; PEREIRA et al., 2014).

A presença da albuminúria ativa a expressão de quimiocinas no túbulo proximal através de mecanismo dependente de fator nuclear *kappa*-B (NF- κ B) (DONADELLI et al., 2000). Sabemos que os glicocorticoides agem no sistema imunológico, particularmente nos linfócitos T, induzindo a remissão da SN. Dentre os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores dos corticosteroides, provavelmente a atenuação da ativação do NF- κ B seja um dos responsáveis pela melhora clínica dos pacientes com SN (WENDERFER, 2012). A principal

droga utilizada para o tratamento da SN é a prednisona. Entretanto, outros imunossupressores também são utilizados de maneira coadjuvante para o tratamento, como ciclofosfamida, micofenolato, tacrolimus e rituximab (ELIE et al., 2012; HODSON; ALEXANDER, 2008).

A inflamação persistente e de baixo grau tem sido reconhecida como componente essencial da doença renal crônica (DRC). Uma variedade de fatores contribui para o estado inflamatório crônico da DRC, incluindo o aumento da produção e redução na depuração de citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo (AKCHURIN; KASKEL, 2015). A relação entre glomerulopatias e inflamação já está bem estabelecida na literatura (OBERG et al., 2004; PECOITS-FILHO; SYLVESTRE; STENVINKEL, 2005). Sabemos também que as doenças glomerulares determinam deterioração mais rápida da função renal quando comparadas a outras etiologias de DRC (SOARES et al., 2009). As lesões glomerulares podem ser deflagradas por diversos mecanismos imunológicos, tais como deposição de imunocomplexos circulantes no tecido renal, formação local de anticorpos com agressão direta na estrutura glomerular, ativação local da cascata do complemento com liberação de mediadores inflamatórios e lesões mediadas por células (HARRIS; NEILSON, 2006). Independente do mecanismo imunológico da lesão glomerular, inicialmente temos a produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS), que promovem ativação de leucócitos, macrófagos e células intrínsecas ao glomérulo renal. Ocorre também ativação das células mesangiais, o que determina alteração fenotípica destas células, que então se transformam em fibroblastos, capazes de liberar proteases, citocinas e mediadores oxidativos, tais como a proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1), o fator de crescimento derivado de plaquetas, o óxido nítrico, e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β , do inglês transforming growth factor beta). O MCP-1 é uma quimiocina que recruta monócitos e macrófagos e atua tanto nas fases iniciais quanto na progressão da lesão túbulo-intersticial renal, induzindo a fibrose no interstício através do recrutamento e ativação de macrófagos que liberam TGF- β . O TGF- β por sua vez possui efeito fibrinogênico sobre as células renais e é conhecido por sua contribuição a progressão da lesão renal através da expansão da matriz extracelular e fibrose tecidual. Assim, a

liberação dessas citocinas pró-inflamatórias contribui para a glomeruloesclerose e a fibrose túbulo-intersticial (COUSER, 1998; HARRIS; NEILSON, 2006; VIANNA et al., 2011).

1.3 Modelo Animal

Existem diversos modelos de indução de proteinúria em animais (SIMIC; TABATABAEIFAR; SCHAEFER, 2013). Entre eles, existe o modelo de indução por doxorrubicina (DOX). O modelo de nefropatia induzida por DOX foi relatado no início dos anos 1980 (BERTANI et al., 1982, 1986) e tem sido amplamente utilizado para investigação de doenças renais que cursam com proteinúria.

A DOX é um fármaco vermelho-alaranjado, solúvel em água e pouco solúvel em álcool, isolado de culturas de *Streptomyces peucetius* var. *Caesius*, utilizado no tratamento de tumores sólidos. É um antibiótico da família das antraciclinas, com uma relação estrutural com a daunomicina. A DOX interage com o DNA celular inibindo a topoisomerase II na quebra das cadeias de DNA induzindo a apoptose celular, liberação de peróxido de hidrogênio e ROS (MIZUTANI et al., 2005; PEREIRA et al., 2015). A doxorrubicina por fim causa alterações na barreira de filtração glomerular como alterações na célula endotelial (inclusive do glicocálice), na membrana basal glomerular e nos podócitos. A espessura do glicocálice é reduzida, o tamanho dos poros das células endoteliais é aumentado, a seletividade da carga glomerular é reduzida e os pedicelos dos podócitos se fundem (LEE; HARRIS, 2011). Em ratos, a DOX induz lesão renal caracterizada por proteinúria precoce, GESF tardia e evolução para DRC. Geralmente nas primeiras duas semanas ocorre elevação da proteinúria e hipoalbuminemia. Ao redor da 8ª semana, o modelo é caracterizado por ainda apresentar pouca alteração microscópica do tecido e da função renal. Geralmente próximo das dezesseis semanas ocorre o desenvolvimento intenso da GESF (OKUDA et al., 1986), por esse motivo foi escolhido 8 semanas como linha de corte para observação do estudo. É um modelo de lesão renal com alta reprodutibilidade, baixa mortalidade (< 5%) e morbidade (LEE; HARRIS, 2011).

Existem diversos outros modelos animais de SN, mas nenhum deles reproduz fielmente a GNLM (SIMIC; TABATABAEIFAR; SCHAEFER, 2013). O modelo da DOX, caracteriza-se nas primeiras semanas por apresentar

proteinúria maciça, hipoalbuminemia, dislipidemia e nenhuma ou quase nenhuma lesão histológica, entretanto, evolui com o decorrer do tempo para GESF e DRC. O tipo de lesão que causa proteinúria no modelo por DOX é a nefrotoxicidade, diferente da origem da proteinúria na GNLM.

As proteínas no fluido tubular estimulam as células a sintetizar quimiocinas inflamatórias, dentre elas o MCP-1, que desempenha um importante papel na patogênese da lesão glomerular e intersticial de diferentes modelos animais e em humanos (EDDY, 2000; VIEDT et al., 2002). Macrófagos, células do túbulo proximal e miofibroblastos também podem estar envolvidos no desenvolvimento da fibrose intersticial e glomerular, uma vez que estas células liberam peptídeos fibrogênicos, tais como o TGF- β (YAMAMOTO et al., 1994). O TGF- β é considerado pela maioria dos autores como uma das principais citocinas fibrogênicas. O aumento da expressão de TGF- β induz a uma série de eventos que resultam na deposição de vários componentes na matriz extracelular (MEC) e em fibrose tecidual (EDDY, 2000; TAMAKI et al., 1994).

Na imunomarcação do tecido renal, pode-se analisar a expressão de proteínas e células relacionadas às lesões celulares. A desmina e a vimentina foram estudadas em diversas formas de lesão renal. Ambas são proteínas de baixa expressão em tecido renal íntegro, ocorrendo um aumento importante da expressão de desmina em região glomerular quando há lesão podocitária (FLOEGE et al., 1992; VAN DEN BRANDEN et al., 2000), enquanto a vimentina é uma proteína que aumenta sua expressão após lesão tubular (GRONE et al., 1987). O tecido renal de animais com lesões induzidas pela DOX mostra, logo nos estágios iniciais, um acúmulo intersticial de macrófagos, um importante componente da imunidade inata, que é uma das características mais marcantes e constantes de lesão renal crônica. Além disto, a intensidade do infiltrado mononuclear é preditiva da progressão da doença subsequente (PEREIRA et al., 2015).

O principal tratamento preconizado para a SN é a corticoterapia, ou tratamento com corticosteroides. A resposta ao tratamento medicamentoso é variável entre os pacientes e, apesar da eficácia do tratamento disponível, principalmente para a população pediátrica, alguns pacientes não atingem o controle da doença. Além disso, os pacientes podem apresentar efeitos

indesejáveis, tais como, síndrome de Cushing, redução do crescimento, osteopenia, osteoporose, catarata e glaucoma (BUSH; SAGLANI, 2010). Desta forma, se faz necessária a busca por novas drogas para o tratamento da SN.

1.4 Fitoterápicos

A utilização de plantas como medicamento remonta às origens da humanidade, com registros mais antigos datando da era paleolítica, e é extensamente difundida em diversos países como, por exemplo, China, Índia, Alemanha e Estados Unidos (FERRO, 2008; LORENZI; MATOS, 2008). Sua principal vantagem em relação à terapia convencional é o sinergismo do fitocomplexo. O isolamento de um único princípio ativo (uma única substância) pode ser vantajoso em algumas situações, mas não em outras, onde a atuação do fitocomplexo é superior à de quaisquer dos componentes isoladamente (FERRO, 2008). Além disso, fitoterápicos com associação de mais de uma espécie permitem a obtenção de maiores efeitos sinérgicos, com utilização de quantidades mais baixas de cada um dos componentes individuais (SAAD et al., 2016). Estima-se que cerca de 80% da população mundial faça uso de plantas ou de suas preparações na atenção primária à saúde.

A utilização de medicamentos fitoterápicos vem sendo estimulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde a declaração de Alma-Ata (WHO, 1978), e também pelo governo brasileiro (Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – Portaria GM nº 971, de 02/05/2006, e Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – Decreto Presidencial 5.813 de 22 de junho de 2006), culminando com a publicação da 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011) e do Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira (ANVISA - COMISSÃO DA FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2016). O SUS possui uma lista de plantas medicinais de especial interesse para a produção de novos medicamentos (BRASIL, 2009). As agências de fomento à pesquisa brasileiras têm lançado editais visando incentivar as pesquisas pré-clínicas e clínicas na área de fitoterapia.

A OMS define os fitoterápicos como sendo medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, obtidos empregando-se exclusivamente derivados

de droga vegetal (extrato total ou processado). A eficácia e a segurança desses medicamentos devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (BRASIL, 2011; CALIXTO, 2003; CARVALHO; SILVEIRA, 2010).

Na atualidade o número de espécies vegetais investigadas quanto aos seus efeitos terapêuticos vem crescendo em função do elevado custo de desenvolvimento de novas drogas sintéticas, que ultrapassam a cifra de 800 milhões de dólares e de 10 a 15 anos de pesquisa (CALIXTO, 2003), dos efeitos colaterais de medicamentos sintéticos e do aprofundamento de estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com espécies vegetais, os quais têm confirmado os efeitos terapêuticos.

Dentre as terapias existentes para o tratamento da SN, os medicamentos fitoterápicos podem assumir grande importância. Inúmeros estudos têm sido publicados sobre o efeito de diversos extratos vegetais com propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras.

Atualmente, no Brasil, a ANVISA regulamentou o uso de algumas espécies vegetais como anti-inflamatórias (BRASIL, 2010, 2011). Estas espécies apresentam potencial para o tratamento da SN por sua atividade muito semelhante à dos corticosteroides, com a vantagem potencial de terem menos efeitos colaterais indesejáveis.

Estudos recentes propõem como tratamento anti-inflamatório a curcumina, um polifenol presente no rizoma da espécie *Curcuma longa* L. (*C. longa*) (“açafrão-da-terra”, Zingiberaceae), que tem sido usada há séculos como remédio anti-inflamatório na medicina asiática. A *C. longa* é aprovada para uso medicinal pela ANVISA.

1.5 *Curcuma longa* L. (“açafrão-da-terra”, Zingiberaceae)

Curcuma longa é o nome de uma planta conhecida como açafrão ou açafrão-da-terra. É uma planta perene da família Zingiberaceae, a mesma do gengibre, amplamente cultivada na Ásia, Índia, China e outros países tropicais, incluindo o Brasil. Ela tem sido usada como medicamento e alimento (na forma de tempero) por mais de 3000 anos. A coloração amarelo-alaranjada vem dos

pigmentos chamados curcuminoides, dos quais a curcumina é o principal representante (**Figura 1**). Os curcuminoides são o princípio ativo do medicamento, que podem ser extraídos em solução hidroetanólica (JAGETIA; AGGARWAL, 2007). Estão presentes três curcuminoides principais: curcumina (75–81%), demetoxicurcumina (15–19%) e bisdemetoxicurcumina (2,2–6,6%) (JURENKA, 2009; PATIL et al., 2009). Eles não são solúveis em água, mas são totalmente solúveis em etanol. Existem evidências de que a mistura dos três curcuminoides seja mais potente do que cada um deles isoladamente (BALAJI; CHEMPAKAM, 2010).

Figura 1 - *Curcuma longa* L.: raiz conhecida como “açafrão-da-terra”

Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Curcuma_longa_roots.jpg

A curcumina possui diversas propriedades farmacológicas, incluindo anti-inflamatória, imunossupressora, antimicrobiana, antiviral, antifúngica, antioxidante, quimiosensibilizante, radiosensibilizante, antiproliferativa e cicatrizante (AMIRGHOFAN, 2012; BLUMENTHAL, 1998; GRUENWALD, 2007; JAGETIA; AGGARWAL, 2007). Em células imunes, ela pode modular tanto a proliferação quanto a ativação de células T, B e macrófagos, entre outras, assim como modular a liberação de mediadores inflamatórios [interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- α), etc.], sobretudo através da supressão da ativação do NF- κ B via bloqueio da fosforilação da quinase inibidora *alfa* do NF- κ B (IKK- α) e inibição da

fosforilação e da degradação da proteína inibitória $\kappa B\alpha$ (I- $\kappa B\alpha$) (AMIRGHOFAN, 2012; JAGETIA; AGGARWAL, 2007; JURENKA, 2009; WONGCHAROEN; PHROMMINTIKUL, 2009; YEH et al., 2005; ZHANG et al., 2010). Em células endoteliais humanas, a curcumina atenuou a resposta inflamatória induzida pelo TNF- α (KIM et al., 2007). A curcumina possui uma grande atividade antioxidante, aproximadamente o dobro da atividade do resveratrol (AFTAB; VIEIRA, 2010). Estas propriedades conferem à curcumina potencial para tratar diversas doenças.

Até o momento, há diversos estudos clínicos em andamento sobre o uso da curcumina em pacientes com diferentes doenças, incluindo alguns tipos de câncer, doença de Alzheimer, epilepsia, psoríase, hipercolesterolemia, etc (JAGETIA; AGGARWAL, 2007; PATIL et al., 2009; WONGCHAROEN; PHROMMINTIKUL, 2009).

A *C. longa* já é utilizada, em humanos, como anti-inflamatório no tratamento da osteoartrite (KUPTNIRATSAIKUL et al., 2014), redução do risco aterogênico em pacientes portadores de diabetes melitus tipo 2 (CHUENGSAARN et al., 2014) e atenuação da lesão miocárdica após cirurgia cardíaca (WONGCHAROEN et al., 2012). Além disso a planta mostra atividade protetora tecidual em modelos animais de lesão miocárdica (NAZAM ANSARI; BHANDARI; PILLAI, 2007; TANWAR et al., 2010; VENKATESAN, 1998; YANG et al., 2013), pulmonar (LIU et al., 2012; OH et al., 2011; SAKURAI et al., 2013) e renal. Em relação a proteção do tecido renal, encontramos na literatura poucos trabalhos; um que foi realizado tratamento profilático com a *C. longa* em forma de extrato concentrado, administrado via oral, 10 dias antes da injeção de DOX (MOHAMAD et al., 2009), um segundo em que foi avaliado a redução do estresse oxidativo e da disfunção renal em ratos diabéticos com uma suspensão de curcumina (SHARMA; KULKARNI; CHOPRA, 2006) e um terceiro que avaliou a atenuação da inflamação renal em ratos injetados previamente com curcumina, 3 dias antes da administração de lipopolissacarídes avaliando a atenuação da produção, ativação ou liberação de MCP-1, ROS e NF- κB (ZHONG et al., 2011).

Recentemente, foi lançado no mercado um medicamento fitoterápico à base de *C. longa*, pelo laboratório Aché, denominado Motore®, para uso como anti-inflamatório na osteoartrite.

Alguns autores afirmam que os compostos da *C. longa* podem, em teoria, ser tóxicos (BALAJI; CHEMPAKAM, 2010). Entretanto, estudos mostram que ao invés disso, a curcumina possui mínima toxicidade e poucos efeitos colaterais, até mesmo em doses elevadas (12g/dia) (BISHT; MAITRA, 2009; BLUMENTHAL, 1998; JAGETIA; AGGARWAL, 2007; KRISHNARAJU et al., 2009; PATIL et al., 2009; WONGCHAROEN; PHROMMINTIKUL, 2009). A *C. longa* é aprovada para uso medicinal em humanos pela ANVISA no Brasil, constando no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011), para uso adulto e infantil. A dose recomendada é de 2,5–5 mL da tintura a 10% para crianças acima de 12 anos, o que equivale a uma dose de 6–12 mg/kg, de uma a três vezes ao dia, ou 18–36 mg/kg/dia. Segundo a OMS, a *C. longa* pode ser usada na forma de droga vegetal (em pó da raiz seca) na dose de 1,5 a 3 g por dia, em adultos. Considerando-se um adulto de 70 kg, em média, a dose pediátrica estará entre 20 e 40 mg/kg/dia (WHO, 1999).

Dentre os efeitos colaterais da *C. longa* está o efeito antiagregação plaquetária derivada da inibição do colágeno e ácido araquidônico via ciclo-oxigenase, semelhante ao efeito da aspirina (LEE, 2006). Também está comprovado o aumento da contratilidade da vesícula biliar (MICUCCI et al., 2013). Seu uso está contraindicado em pessoas com obstrução das vias biliares, hiperacidez ou úlceras gástricas, e na gestação. Pode interagir com anticoagulantes, agentes antiplaquetários, heparina de baixo peso molecular e agentes trombolíticos, aumentando o risco de sangramentos (GRUENWALD, 2007).

Como o isolamento da curcumina pura a partir da droga vegetal é trabalhoso, há extratos disponíveis no mercado que contêm uma mistura dos três curcuminoides (PATIL et al., 2009). A curcumina possui baixa solubilidade em água, meia vida curta e razoável biodisponibilidade após administração oral (BISHT; MAITRA, 2009; PATIL et al., 2009), o que não afeta sua atividade terapêutica (BALAJI; CHEMPAKAM, 2010).

Desta forma, considerando que o tratamento disponível atualmente para SN em alguns pacientes não atinge o controle da doença, e que essas drogas possuem muitos efeitos colaterais indesejáveis, são necessários mais estudos para utilização de novos medicamentos anti-inflamatórios e imunossupressores para o tratamento da SN. Uma das alternativas seria a utilização de

medicamentos fitoterápicos. Devido ao seu efeito anti-inflamatório e imunossupressor, realizamos este estudo para testar o uso de *C. longa*, em forma de droga vegetal misturada a ração, em um modelo animal de SN induzida por DOX, visando reduzir a albuminúria, o processo inflamatório no tecido renal e, possivelmente, a velocidade de progressão para DRC.

Objetivos

---

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos da administração da droga vegetal de *C. longa* no tratamento da SN induzida por DOX em um modelo experimental com ratos da linhagem Wistar.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da droga vegetal de *C. longa*:

- 1- Na redução da proteinúria, por meio das dosagens de albuminúria;
- 2- Na redução da inflamação renal, por meio das dosagens dos mediadores inflamatórios urinários MCP-1 e TGF- β ;
- 3- Na expressão do marcador de diferenciação podocitária (desmina), do marcador de lesão tubular (vimentina) e do marcador de infiltração tecidual de macrófagos (células ED-1⁺), por meio da imuno-histoquímica;

Material e Métodos

---

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP, em protocolo número 057/2014 em 30 de março de 2015 (ANEXO I).

3.1 Material

3.1.1 Preparo da droga vegetal

A espécie foi cultivada na instituição Casa Espírita Terra de Ismael (Farmacêutico Responsável: Anne Cristina Ferreira, CRF-SP 34.696, CNPJ: 01.824.056/0001-23, localização: latitude 21°4'33" sul, longitude 47°44'48" oeste) com autorização do governo brasileiro.

As plantas foram coletadas às 9 horas da manhã, e uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

Rizomas de *C. longa* foram coletados e secos por 7 dias em estufa de ar circulante a 45 °C. O material seco foi então triturado em moinho de facas até a granulometria de 32 mesh. O pó resultante é a droga vegetal. Esta foi submetida a controle de qualidade químico. Os marcadores ativos curcumina e demetoxicurcumina (curcuminoides) foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A droga vegetal foi preparada no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UNAERP, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira.

3.1.2 Quantificação dos curcuminoides

Os curcuminoides foram quantificados por HPLC seguindo a metodologia descrita por Jayaprakasha (JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2002), foram analisadas as concentrações dos curcuminoides de rizoma de *C.*

longa em pó recém-produzido (RI) e encapsulado e armazenado em temperatura ambiente (26 ± 2 °C) armazenados por 2 anos (RP).

Os fitocomplexos (5 mg) foram separadamente misturados a metanol (1 mL) e sonicados durante 15 minutos em ultrassom (Eco-sonics Q-5,9 / 37, W154 e 37kHz). O sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore (tamanho de poro de 0,22 µm) e injetado em HPLC.

A HPLC utilizada foi o modelo LC-10-AVP Shimadzu® (Quioto, Japão) equipado com um auto-injetor SIL-10AF, um detector de matriz de fotodíodos SPD-M20A e uma coluna Luna C18 Phenomenex® (Torrance, CA, EUA) (250 x 4,6 mm de diâmetro e 5 µm de tamanho de partícula). O sistema de injeção (Shimadzu®) utilizado foi um ciclo de amostra de 20 µL. Um detector de comprimento de onda variável de Shimadzu SPD-M10A VP configurado a 420 nm foi utilizado para detecção. Um filtro de membrana Millipore® (Bangalore, Índia) (tamanho de poro de 0,22 µm) foi utilizado para filtração.

Amostras (25 µL) foram injetadas na HPLC. A concentração de curcuminoides foi determinada utilizando equações lineares considerando os fatores de diluição. Os teores de curcumina e de demetoxicurcumina foram expressos em µg/g de peso seco.

3.1.3 Dose da droga vegetal

A *C. longa* foi administrada aos animais misturada à ração, na dose de 250 mg/kg/dia, por 8 semanas após a injeção de DOX.

Dados da literatura mostram que ratos ingerem em média 5 g de ração para cada 100 g de peso corporal por dia. Isso significa que ingerem, em média, 50 g/kg/dia de ração (BATISTA MASSENO et al., 2009). A partir desta proporção, estimamos que a quantidade de droga vegetal que deveria ser misturada a ração, para fornecermos 250 mg/kg/dia a um rato adulto de 500 g, seria de 250 mg de *C. longa* em cada 50 g de ração.

3.1.4 Preparo da Ração

Foi utilizada ração padrão do biotério (Nuvilab®, Curitiba, PR, Brasil) que foi moída em desintegrador DPM-4 (Nogueira, Itapira, SP, Brasil) com peneira número 2, e nela foi misturada a droga vegetal de *C. longa* na proporção de 250 mg para cada 50 g de ração (concentração final de 5 mg/g). Essa mistura foi levada a um misturador helicoidal MA 206 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) por 10 minutos e depois foi novamente peletizada em peletizadora Rosim modelo 0337 (Rosim, Boa Esperança do Sul, SP, Brasil) para ser fornecida aos animais.

O processo de moagem da ração, mistura da droga vegetal e peletização da ração foi realizada no CEPTOX - Centro de Pesquisas em Toxicologia Veterinária - Responsável Profa. Dra. Silvana L. Górnaiak, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia no campus da USP de Pirassununga-SP.

3.1.5 Caracterização da Amostra Animal

Foram utilizados 39 ratos, *Rattus norvegicus*, machos, da linhagem Wistar, com seis a oito semanas de idade e peso individual entre 220 e 290 g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Prefeitura do Campus da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP.

3.1.6 Ambiente dos Experimentos

Os animais foram mantidos em caixas com três a quatro ratos. A cada duas semanas os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, para avaliação do volume urinário e coleta de urina de 24 h. O biotério apresentava como características a manutenção rigidamente controlada das condições ambientais como a temperatura de 22 °C, ciclo dia-noite com regulação artificial de 12 horas e livre acesso a água e alimento. Foi utilizada a ração padrão do biotério da Universidade de São Paulo (USP) (Nuvilab®)

contendo em cada 100 g de ração 350,5 Kcal, 55 g de carboidratos, 22,5 g de proteínas, 4,5 g de gordura e 8 g de fibras.

3.1.7 Modelo experimental de SN induzido por DOX

Para a indução da lesão renal por DOX (Fauldoxo®, Libbs Farmacêutica, Embu, SP, Brasil), os animais foram sedados com anestésico inalatório Isoflurano (Isoforine®, Cristália, Itapira, SP, Brasil) por aproximadamente 10 segundos, e após estarem completamente sedados foi realizada administração intravenosa de DOX na dose de 3,5 mg / kg na veia dorsal da cauda. O vaso foi localizado por observação direta e a administração realizada lentamente, cuidando para que não houvesse extravasamento da droga em tecido extra-vascular.

3.2 **Delineamento experimental**

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Renal da FMRP-USP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra.

3.2.1 Distribuição dos grupos

Os ratos foram divididos em quatro grupos, com nove ou dez ratos cada, conforme descrito abaixo:

- **Grupo SAL-PAD:** Os ratos foram injetados com solução salina e receberam ração padrão durante o período de tratamento (n=9);
- **Grupo SAL-CUR:** os ratos foram injetados com solução salina e receberam ração misturada a *C. longa* durante o período de tratamento (n=10);
- **Grupo DOX-PAD:** os ratos foram injetados com doxorrubicina e receberam ração padrão durante o período de tratamento (n=10);

- **Grupo DOX-CUR:** Os ratos foram injetados com doxorrubicina e receberam ração misturada a *C. longa* durante o período de tratamento (n=10);

A injeção de DOX foi realizada no D0 do estudo. Os animais foram pesados quinzenalmente. A ração colocada nas caixas foi pesada e, após 48 horas, pesada novamente para realizar uma média de ingesta dos animais. Nos dias 14 (D14), 28 (D28), 42 (D42) e 56 (D56) do estudo, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais e foram coletadas amostras de urina. O volume urinário de 24 horas foi determinado e foram quantificadas as concentrações de albumina, creatinina, sódio, potássio e osmolalidade urinária.

No D56 os ratos foram anestesiados por 30 minutos com tiopental sódico, administrado via intraperitoneal, na dose de 40 mg/kg e, após estarem completamente sedados, foram coletadas amostras de sangue e urina. O sangue foi coletado através da cateterização da veia cava inferior para dosagem sérica de albumina, creatinina, sódio, potássio, colesterol e osmolalidade. Para a coleta da urina, o animal foi mantido em placa aquecedora e foram canuladas a traqueia e a bexiga do animal. Amostras de urina foram mantidas congeladas a -70 °C para dosagem dos marcadores MCP-1 e TGF- β urinários. Após a coleta, os animais foram sacrificados e o rim esquerdo foi coletado, seccionado e fixado em solução de *methanol-Carnoy* (methacarn) por 24 horas. Após a fixação do tecido, este foi armazenado em etanol 70%.

3.3 Determinação dos níveis séricos e urinários

Amostras de urina foram conservadas pela adição de azida sódica e determinado o volume em proveta graduada. Uma alíquota foi separada e armazenada a -20 °C. As dosagens de albuminúria e creatinina urinária foram realizadas em aparelho Wiener Metrolab 2300 Plus (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina) utilizando-se kits de dosagem de microalbuminúria (Wiener Microalbumina Turbitest AA) pelo método de imunoturbidimétrico, e de creatinina urinária (Wiener Creatinina Cinética AA) pelo método cinético. Para

avaliação da albuminúria, foi realizada a relação entre a albumina e a creatinina urinária (RAC) e a albuminúria de 24 horas (Alb24h).

As amostras séricas e urinárias do 56º dia do experimento foram utilizadas para as dosagens de sódio e potássio, no aparelho AVL 9180 Electrolyte Analyser Roche (F.Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) pelo método do eletrodo de íon seletivo. As osmolalidades foram quantificadas pela redução do ponto de pressão de vapor no aparelho Wescor Vapro Pressure Osmometer 5600 (Wescor, Puteaux, FR).

Na amostra de sangue do 56º dia, foi quantificada a albumina sérica pelo kit Albumina-PP Analisa (Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil) realizando a quantificação colorimétrica pelo Verde de Bromocresol em espectrofotômetro Genesys 10S (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), o colesterol total e a creatinina sérica no aparelho Wiener Metrolab 2300 Plus (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina) utilizando-se kits de dosagem de colesterol (Wiener Colestat enzimático AA) pelo método fotolorimétrico e de creatinina (Wiener Creatinina Cinética AA) pelo método cinético.

Nas amostras de urina separadas para a determinação do MCP-1 e TGF- β urinários, as amostras foram tratadas imediatamente com 1 mM do inibidor proteolítico PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*). A quantificação urinária foi feita por enzimo-imunoensaio (ELISA), utilizando-se kits da Promega e Pierce, respectivamente (Promega Corporation, Madison, MO, USA e Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Os valores de TGF- β e MCP-1 nas amostras de urina foram expressos em picogramas (pg) de TGF- β ou MCP-1 por mg de creatinina.

3.4 Análise histológica

As lâminas para leitura de microscopia de luz (ML) e de imuno-histoquímica (IH) foram realizadas pelo laboratório de Patologia Renal da FMRP-USP.

3.4.1 Microscopia de luz

As secções histológicas (3 µm) foram coradas com Tricrômio de Masson para microscopia de luz. As lesões glomerulares foram avaliadas por escores que refletiam a extensão da lesão (0: 0-5%; 1: 5-25%; 2: 25-50%; 3: 50-75%; 4: >75%)

As lesões túbulo-intersticiais (dilatação da luz tubular e atrofia tubular, fibrose e infiltrado inflamatório) encontradas na região do córtex renal foram avaliadas por escore (SHIH; HINES; NEILSON, 1988): 0: normal; 0,5: alterações discretas e focais; 1: alterações acometem menos que 10% do córtex; 2: acometimento de 10-25% do córtex; 3: acometimento de 25-75% do córtex; 4: lesão extensa acometendo mais de 75% do córtex. Foram avaliados 50 glomérulos e 20 campos (medindo 0,245 mm²/campo) de cada animal e determinado então um escore médio glomerular e túbulo-intersticial para cada animal.

3.4.2 Imuno-histoquímica

Os cortes do tecido de 3 µm foram desparafinizados e submetidos a IH no laboratório de fisiologia renal da FMRP-USP.

O material foi inicialmente incubado com os seguintes anticorpos primários:

Para avaliação da barreira de filtração:

- **Anti-desmina:** monoclonal (Dako A/S, Dinamarca), incubação por 60 min em temperatura ambiente (1/100). A desmina é um componente do citoesqueleto cuja expressão nas células epiteliais dos glomérulos tem sido relacionada à lesão dos processos podais, sendo considerada, portanto, como um marcador sensível para detecção da lesão dos processos podais;

Para avaliação das alterações das células tubulares:

- **Anti-vimentina:** monoclonal (Dako A/S, Dinamarca), incubação por 60 min em temperatura ambiente (1/500). Presença da reação para

vimentina nas células dos túbulos renais é sugestiva de lesão tubular recente ou falta de diferenciação das células dos túbulos renais.

Para avaliação do processo inflamatório:

- **Anti-ED1:** monoclonal (Serotec, EUA), incubação por 60 min em temperatura ambiente (1/1.000). Esse anticorpo reage com antígenos presentes no citoplasma de macrófagos e monócitos.

Os cortes, foram lavados com solução de PBS (do inglês, *phosphate-buffered saline*) e incubados com anticorpos secundários biotinilados anti-imunoglobulina G (IgG) de camundongo. O produto da reação foi detectado com o sistema avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, EUA) e a cor desenvolvida pela adição de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Company, EUA) na presença de água oxigenada. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primários e secundários com solução de PBS, contendo albumina bovina (1%). A contracoloração foi realizada com *methylgreen*.

A avaliação dos resultados da imunorreação para as células ED-1 positivas (ED-1⁺) por glomérulo ou por área do córtex renal medindo 0,245 mm² foi feita determinando o número médio de células por campo e por glomérulo para cada animal. A avaliação das demais imunorreações foi realizada determinando um escore médio por área de córtex renal (0,245 mm²) ou por glomérulo para cada animal, utilizando escores que refletiam a extensão da área marcada, sendo atribuído um escore de 0 a 4 (0: 0% a 5% da área; 1: entre 5% e 25%; 2: entre 25% e 50%; 3: entre 50% e 75%; 4: entre 75% e 100%). Para todas as imunorreações acima foram avaliados. Para todas as imunorreações acima, foram analisados no mínimo 40 campos de 0,245 mm² e 50 glomérulos e determinado um escore médio glomerular e túbulo-intersticial para cada animal.

3.5 Análise estatística

Os resultados das variáveis de coletas repetidas (peso, ingesta de ração, ingesta de droga, volume urinário, albuminúria e relação albumina/creatinina na

urina) foram analisados utilizando *two-way* ANOVA de medidas repetidas e comparados com seus respectivos controles utilizando o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O método utilizado para avaliar as amostras urinárias, séricas e de tecido coletadas no 56^o dia de experimento [sódio (Na), potássio (K), creatinina, albumina, colesterol, osmolalidade, relação MCP-1/creatinina, relação TGF- β /creatinina, fração de excreção de sódio (FeNa), fração de excreção de potássio (FeK), escores de lesão na microscopia de luz e imuno-histoquímica] foi o *one-way* ANOVA seguido de pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Foi utilizado o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Resultados

---

4 RESULTADOS

4.1 Quantificação de curcuminoides na droga vegetal

Níveis de curcumina e demetoxicurcumina em amostras de *C. longa* em pó recém-produzida ou armazenadas durante 2 anos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$), como demonstrado na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Concentração de curcuminoides em amostras de *C. longa* analisadas por HPLC em (mg/g) de peso seco

Amostra	Curcumina	Demetoxicurcumina
RI	37,15	5,12
RP	45,31	6,94

RI, rizoma em pó intacto (recém-produzido); RP rizoma em pó armazenado por 2 anos.

4.2 Peso dos animais

Os animais foram pesados quinzenalmente antes de serem colocados nas gaiolas metabólicas para coleta das amostras urinárias. Não houve diferença significativa do peso entre os grupos ao longo do tempo ($p=0,0741$). Entretanto, percebemos que os grupos com lesão renal (DOX-PAD e DOX-CUR) apresentaram menor ganho de peso no decorrer do tempo se comparados aos que não apresentavam lesão renal (SAL-PAD e SAL-CUR). Nosso modelo foi semelhante aos modelos descritos na literatura (OKUDA et al., 1986; PEREIRA et al., 2015), conforme apresentado na **Figura 2**.

Figura 2 - Variação do peso dos animais

Peso avaliado a cada 14 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos durante o período avaliado ($p=0,0741$).

4.3 Ingesta de ração por animal

Foi realizada uma média de ingestão de ração por rato, em gramas por dia. Não houve diferença significativa na ingestão de ração entre os grupos ($p=0,6797$) (**Figura 3**).

Figura 3 - Variação da ingestão de ração

Ingesta avaliada a cada 14 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos durante o período avaliado ($p=0,6797$).

4.4 Ingesta da droga vegetal

A ingestão de droga vegetal por animal foi superior à estimada inicialmente, tendo ficado em torno de 400 mg/kg/dia (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Ingesta de ração em gramas por dia (g/dia) e ingestão de droga vegetal em miligramas por quilograma por dia (mg/kg/dia)

Grupo	Ingesta de ração (g/dia)	Ingesta de <i>C. longa</i> (mg/kg/dia)
SAL-PAD	34,02 (32,57; 39,12)	
SAL-CUR	36,35 (33,49; 39,35)	382,3 (331,8; 431,2)
DOX-PAD	35,92 (34,98; 38,63)	
DOX-CUR	35,98 (32,58; 37,41)	415,9 (352,1; 445,8)

DOX, doxorrubicina; CUR, ração com *C. longa*; SAL, solução salina isotônica; PAD, ração padrão. O estudo foi realizado por 8 semanas. Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (p25; p75).

Não houve diferença significativa de ingestão de droga vegetal entre o grupo doente tratado com doxorrubicina (DOX-CUR) e o controle tratado com solução salina (SAL-CUR) no decorrer do tempo ($p=0,2172$) (**Figura 4**).

Figura 4 - Variação da ingestão de droga vegetal de *Curcuma longa*

Ingesta avaliada a cada 14 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos durante o período avaliado ($p=0,2172$).

4.5 Volume urinário

Comparando o volume urinário entre os grupos nos dias D14, D28, D42 e D56, encontramos que não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do tempo ($p=0,3060$) (**Figura 5**).

Figura 5 - Variação do volume urinário

Volume avaliado a cada 14 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos durante o período avaliado ($p=0,3060$).

4.6 Relação albumina e creatinina urinária e albuminúria de 24 horas

A relação entre albumina e creatinina urinária e a albuminúria de 24h estão apresentadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Relação entre albumina e creatinina urinária e albuminúria de 24 horas

Grupo	RAC	Alb24h (mg/24hs)
SAL-PAD	0,06 (0,02; 0,36)	0,04 (0,02; 0,38)
SAL-CUR	0,03 (0,01; 0,12)	0,04 (0,00; 0,13)
DOX-PAD	6,75 (3,31; 7,70)	6,89 (3,36; 7,94)
DOX-CUR	8,77 (1,76; 10,2)	7,56 (2,98; 11,46)

DOX, doxorubicina; CUR, ração com *C. longa*; SAL, solução salina isotônica; PAD, ração padrão; RAC, relação entre albumina e creatinina urinária; Alb24h, albuminúria de 24 horas. O estudo foi realizado por 8 semanas. Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (p25; p75).

Os dados da foram transformados em logaritmo antes da análise estatística porque não apresentavam distribuição normal. Houve diferença

significativa da albuminúria entre os grupos tratados com doxorrubicina (DOX-PAD e DOX-CUR) e os controles (SAL-PAD e SAL-CUR) com $p < 0,0001$ nas duas análises. Os grupos SAL-PAD e SAL-CUR se mantiveram com proteinúria praticamente insignificante durante todo o estudo. Entre os grupos em que a lesão renal foi induzida com doxorrubicina (DOX-CUR e DOX-PAD), no D14 já havia uma proteinúria importante em ambos os grupos, que se manteve no D28 e D42. Houve uma queda da albuminúria no grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR) a partir do D56 se comparado ao grupo sem tratamento (DOX-PAD), entretanto não houve diferença significativa entre eles (RAC com $p = 0,5741$ e Alb24h com $p = 0,7358$), como demonstrado na **Figura 6**.

Figura 6 - Relação entre albumina e creatinina urinária (a) e albuminúria de 24h (b), com o respectivo erro padrão da média

Nos dois casos não houve diferença significativa entre o grupo tratado com doxorrubicina e alimentados com ração padrão (DOX-PAD) e alimentado com ração contendo *C. longa* (DOX-CUR) com $p = 0,5741$ (a); $p = 0,7358$ (b).

4.7 Albumina sérica

A análise da albumina sérica foi realizada na amostra de sangue coletado no 56º dia de estudo. Houve uma queda significativa da albumina sérica nos grupos tratados com a doxorrubicina (DOX-PAD e DOX-CUR), mas apesar da mediana da albumina sérica no grupo tratado com *C. longa* ter ficado

mais alta do que aquele que não foi tratado, estatisticamente não houve diferença entre os dois grupos ($p=0,4647$) (**Figura 7**).

Figura 7 - Albumina sérica da amostra coletada no D56 do estudo

Houve diferença significativa entre os grupos tratados com doxorubicina e não tratados (* $p=0,0190$; ** $p=0,0053$; *** $p=0,0004$), entretanto não houve diferença entre o grupo tratado e não tratado com *C. longa* (DOX-PAD e DOX-CUR) com $p=0,4647$.

4.8 Colesterol sérico

A análise do colesterol sérico foi realizada na amostra de sangue coletado no 56º dia de estudo. Assim como esperado, houve um aumento do colesterol nos animais com síndrome nefrótica (DOX-CUR e DOX-PAD), entretanto não houve diferença significativa ($p=0,6426$) na análise entre o grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR) e não tratado (DOX-PAD) (**Figura 8**).

Figura 8 - Colesterol sérico da amostra coletada no D56 do estudo

Houve diferença significativa entre os grupos tratados com doxorrubicina e não tratados (* $p=0,0014$; ** $p=0,0055$; *** $p=0,0410$), não houve diferença entre o grupo tratado e não tratado com *C. longa* (DOX-PAD e DOX-CUR) com $p=0,6426$.

4.9 Creatinina sérica

Houve diferença significativa entre o grupo controle SAL-PAD e o grupo de interesse (DOX-CUR) ($p=0,0401$) mas sem importância na análise já que os animais encontravam-se com a creatinina dentro da faixa normal (MELO et al., 2013) (**Figura 9**).

Figura 9 - Creatinina sérica da amostra coletada no D56 do estudo

Houve diferença significativa entre o grupo controle SAL-PAD e DOX-CUR (* $p=0,0401$). Os animais encontravam-se com a creatinina dentro da faixa normal.

4.10 Sódio sérico

A análise do sódio sérico foi realizada na amostra de sangue coletado no 56º dia de estudo. Assim como a função renal, as medianas dos valores de sódio sérico dos grupos permaneceram dentro da faixa normal (MELO et al., 2013). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,4252$) (**Figura 10**).

Figura 10 - Sódio sérico da amostra coletada no D56 do estudo

Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,4252$) e o sódio permaneceu em níveis normais.

4.11 Potássio sérico

A análise do potássio sérico foi realizada na amostra de sangue coletado no 56º dia de estudo e, da mesma maneira que a creatinina e o sódio, a mediana dos quatro grupos permaneceu na faixa da normalidade para animais (MELO et al., 2013). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,6026$) (**Figura 11**).

Figura 11 - Potássio sérico da amostra coletada no D56 do estudo

Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,6026$) e o potássio permaneceu em níveis normais.

4.12 Frações de excreção de sódio (FeNa) e de potássio (FeK)

As frações de excreção de sódio e potássio foram realizadas com as amostras de sangue e urina coletadas no 56º dia do experimento.

Na análise da FeNa, houve diferença entre os grupos SAL-CUR e DOX-PAD ($p=0,005$) mas sem significância clínica já que o FeNa e o FeK permaneceram na faixa normal em todos os grupos (BAZZANO et al., 2015), como mostrado nas **Figura 12** e **Figura 13**.

Figura 12 - Fração de excreção de sódio (FeNa) coletado no D56 do estudo

Houve diferença entre os grupos SAL-CUR e DOX-PAD (**p=0,005). O FeNa permaneceu em níveis normais em todos os grupos.

Figura 13 - Fração de excreção de potássio (FeK) coletado no D56 do estudo

Não houve diferença significativa entre os grupos (p=0,6879). A FeK permaneceu em níveis normais em todos os grupos.

4.13 Osmolalidade sérica

As osmolalidades séricas dos animais foram realizadas com as amostras de sangue coletadas no D56 e estavam normais em todos os grupos. Não houve diferença significativa entre os quatro grupos ($p=0,1558$) (**Figura 14**).

Figura 14 - Osmolalidade sérica de amostra de sangue coletado no D56 do estudo

Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,1558$).

4.14 Osmolalidade urinária

Os valores de osmolalidade urinária dosadas nas urinas no 56º dia de estudo, mostraram uma diferença entre os grupos com lesão renal (DOX-CUR e DOX-PAD) e sem (SAL-CUR e SAL-PAD), com menor osmolalidade nos grupos doentes, sugerindo uma perda de capacidade de concentração urinária após 8 semanas de acompanhamento. Houve diferença significativa entre os grupos SAL-CUR e DOX-CUR ($p=0,0055$). Não houve diferença entre os grupos doentes tratados e não tratados com *C. longa* (DOX-PAD vs DOX-CUR, $p=0,5581$) (**Figura 15**).

Figura 15 - Osmolalidade urinária de amostra coletada no D56 do estudo

Houve diferença significativa entre os grupos SAL-CUR e DOX-CUR (** $p=0,0055$). Não houve diferença entre os grupos DOX-PAD e DOX-CUR ($p=0,5581$).

4.15 MCP-1 urinário/creatinina urinária

Os valores da relação entre MCP-1/creatinina urinários estão mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Relação entre MCP-1/creatinina urinária

Grupo	Relação MCP-1/creatinina (pg/mg)
SAL-PAD	440,6 (258,7; 844,7)
SAL-CUR	557,3 (348,9; 1334)
DOX-PAD	2565 (2206; 2970)
DOX-CUR	638,3 (317,9; 1606)

DOX, doxorubicina; CUR, ração com *C. longa*; SAL, solução salina isotônica; PAD, ração padrão; MCP-1, proteína quimiotática para monócitos e macrófagos-1. O estudo foi realizado por 8 semanas. Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (p25; p75).

Houve uma diferença significativa entre os grupos com lesão renal DOX-PAD e DOX-CUR ($p<0,0001$) com valores de MCP-1/creatinina menores na urina do grupo tratado com a droga vegetal *C. longa*, sugerindo uma atenuação importante na expressão deste mediador inflamatório renal no grupo tratado com a droga vegetal. Além disso, não houve diferença estatística entre o grupo

doente tratado com *C. longa* (DOX-CUR) e os 2 grupos controles (SAL-PAD com $p=0,4863$ e SAL-CUR com $p=0,9692$) (**Figura 16**).

Figura 16 - Relação entre a proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1) e a creatinina da amostra urinária coletada no D56 do estudo

Houve diferença significativa entre os grupos tratados com doxorrubicina e alimentados com ração padrão (DOX-PAD) e alimentados com *C. longa* (DOX-CUR) com $***p<0,0001$, também houve diferença com seus controles ($*p<0,0001$; $**p<0,0001$). Não houve diferença entre o grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR) e os controles SAL-PAD ($p=0,4863$) e SAL-CUR ($p=0,9692$).

4.16 TGF- β urinário/creatinina urinária

Os valores de TGF- β /creatinina urinários nas amostras de urina estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Relação entre TGF- β /creatinina urinária

Grupo	Relação TGF- β /creatinina (pg/mg)
SAL-PAD	47,81 (30,23; 57,51)
SAL-CUR	82,19 (36,98; 162,5)
DOX-PAD	430,4 (319; 1082)
DOX-CUR	409,8 (91,66; 452,3)

DOX, doxorrubicina; CUR, ração com *C. longa*; SAL, solução salina isotônica; PAD, ração padrão; TGF- β , fator de crescimento transformador beta. O estudo foi realizado por 8 semanas. Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (p25; p75).

Houve uma diferença significativa entre os grupos com lesão renal DOX-PAD e DOX-CUR (* $p=0,0264$) com valores de TGF- β /creatinina menores na urina do grupo tratado com a droga vegetal *C. longa* (**Figura 17**).

Figura 17 - Relação entre o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e a creatinina da amostra urinária coletada no D56 do estudo

Houve diferença significativa entre os grupos tratados com doxorrubicina e alimentados com ração padrão (DOX-PAD) e alimentados com *C. longa* (DOX-CUR) com * $p=0,0264$, também houve diferença com seus controles (** $p=0,0002$; *** $p<0,0001$). Não houve diferença entre o grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR) e os controles SAL-PAD ($p=0,1546$) e SAL-CUR ($p=0,2606$).

4.17 Microscopia de luz

O estudo histológico revelou as seguintes alterações morfológicas do modelo no córtex renal dos ratos tratados com DOX: glomeruloesclerose,

dilatação da luz tubular, achatamento das células tubulares com perda da borda em escova, atrofia tubular e aumento da fibrose intersticial (**Figura 18 e Tabela 6**).

Figura 18 - Cortes histológicos corados com Tricrômio de Masson de córtex renal

(a)- animal controle (SAL-PAD); (b)- animal tratado com doxorubicina e alimentado com ração padrão (DOX-PAD); (c)- animal tratado com doxorubicina e alimentado com ração contendo *C. longa* (DOX-CUR). Barra indica 50 µm. O tratamento foi realizado por 8 semanas. Observar a presença de dilatação e atrofia tubular, aumento de matriz intersticial e glomeruloesclerose nos cortes (b) e (c). Nota-se atenuação da lesão no corte (c) do animal tratado com *C. longa* (DOX-CUR).

Tabela 6 - Escores de lesão glomerular e lesão túbulo-intersticial de córtex renal corado por Tricrômio de Masson

Grupo	Escore para lesão glomerular	Escore para lesão túbulo intersticial
SAL-PAD	0,02 (0; 0,04)	0 (0; 0)
SAL-CUR	0,01 (0; 0,04)	0 (0; 0)
DOX-PAD	0,61 (0,465; 0,85)	2,15 (1,781; 2,513)
DOX-CUR	0,13 (0,08; 0,175)	0,525 (0,3375; 0,725)

DOX, doxorubicina; CUR, ração com *C. longa*; SAL, solução salina isotônica; PAD, ração padrão; escore para lesão glomerular (0: 0-5%; 1: 5-25%; 2: 25-50%; 3: 50-75%; 4: >75%); Escore para lesões túbulo-intersticiais: 0: normal; 0,5: alterações discretas e focais; 1: alterações acometem menos que 10% do córtex; 2: acometimento de 10-25% do córtex; 3: acometimento de 25-75% do córtex; 4: lesão extensa acometendo mais de 75% do córtex. O estudo foi realizado por 8 semanas. Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (p25; p75).

Houve uma diferença significativa entre os grupos com lesão renal (DOX-PAD e DOX-CUR) tanto para a avaliação do escore de lesão glomerular ($p < 0,0001$) como do escore de lesão túbulo intersticial ($p < 0,0001$), com escores menores no tecido renal do grupo tratado com a droga vegetal *C. longa* (**Figura 19 e Figura 20**).

Figura 19 - Escore para avaliação de lesão glomerular de córtex renal corado por Tricrômio de Masson

Houve diferença significativa entre os grupos tratados com doxorubicina e alimentados com ração padrão (DOX-PAD) e alimentados com *C. longa* (DOX-CUR) com ***** $p < 0,0001$ também houve diferença com seus controles (** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$). Não houve diferença entre o grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR) e os controles SAL-PAD (** $p = 0,0945$) e SAL-CUR (* $p = 0,0761$).

Figura 20 - Escore para avaliação de lesão túbulo-intersticial de córtex renal corado por Tricrômio de Masson

Houve diferença significativa entre os grupos tratados com doxorrubicina e alimentados com ração padrão (DOX-PAD) e alimentados com *C. longa* (DOX-CUR) com **** $p < 0,0001$, também houve diferença com seus controles (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0001$). Houve diferença entre o grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR) e os controles SAL-PAD (** $p = 0,0057$) e SAL-CUR (* $p = 0,0042$).

4.18 Desmina

Exemplos da marcação da desmina por IH no tecido renal estão mostrados na **Figura 21**, e os resultados, na **Tabela 7**.

Figura 21 - Cortes histológicos com imunomarcção para desmina

(a)- animal controle (SAL-PAD); (b)- animal tratado com doxorrubicina e alimentado com ração padrão (DOX-PAD); (c)- animal tratado com doxorrubicina e alimentado com ração contendo *C. longa* (DOX-CUR). Barra indica 50 µm. O tratamento foi realizado por 8 semanas. Observar a marcação mais intensa glomerular nos cortes (b) e (c). Nota-se atenuação da lesão no corte (c) do animal tratado com *C. longa* (DOX-CUR).

Tabela 7 - Escore de imunomarcção para desmina no compartimento glomerular do córtex renal

Grupo	Escore de imunomarcção para desmina
SAL-PAD	0 (0; 0,02)
SAL-CUR	0 (0; 0)
DOX-PAD	0,89 (0,775; 1,255)
DOX-CUR	0,28 (0,13; 0,37)

DOX, doxorrubicina; CUR, ração com *C. longa*; SAL, solução salina isotônica; PAD, ração padrão; escore de imunomarcção para desmina no compartimento glomerular (0: 0-5%; 1: 5-25%; 2: 25-50%; 3: 50-75%; 4: >75%). O estudo foi realizado por 8 semanas. Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (p25; p75).

Houve uma diferença significativa entre os grupos com lesão renal (DOX-PAD e DOX-CUR) para a avaliação do escore para desmina de lesão glomerular ($p < 0,0001$), com atenuação da marcação no tecido renal do grupo tratado com a droga vegetal *C. longa* (**Figura 22**).

Figura 22 - Escore de imunomarcção para desmina no compartimento glomerular do córtex renal

Houve diferença significativa entre os grupos tratados com doxorrubicina e alimentados com ração padrão (DOX-PAD) e alimentados com *C. longa* (DOX-CUR) com ***** $p < 0,0001$ também houve diferença com seus controles (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0001$). Houve diferença entre o grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR) e os controles SAL-PAD (** $p = 0,0345$) e SAL-CUR (* $p = 0,0235$).

4.19 Vimentina

Exemplos da marcação de vimentina por IH em tecido renal são mostrados na **Figura 23**, e os resultados, na **Tabela 8**.

Figura 23 - Cortes histológicos com imunomarcagem para vimentina

(a)- animal controle (SAL-PAD); (b)- animal tratado com doxorrubicina e alimentado com ração padrão (DOX-PAD); (c)- animal tratado com doxorrubicina e alimentado com ração contendo *C. longa* (DOX-CUR). Barra indica 50 µm. O tratamento foi realizado por 8 semanas. Observar a marcação mais intensa túbulo-intersticial nos cortes (b) e (c). Nota-se atenuação da lesão no corte (c) do animal tratado com *C. longa* (DOX-CUR).

Tabela 8 - Escore de imunomarcagem para vimentina no compartimento túbulo-intersticial do córtex renal

Grupo	Escore de imunomarcagem para vimentina
SAL-PAD	0 (0; 0)
SAL-CUR	0 (0; 0)
DOX-PAD	0,83 (0,555; 1,085)
DOX-CUR	0,51 (0,24; 0,625)

DOX, doxorrubicina; CUR, ração com *C. longa*; SAL, solução salina isotônica; PAD, ração padrão; escore de imunomarcagem para vimentina no compartimento túbulo-intersticial (0: 0-5%; 1: 5-25%; 2: 25-50%; 3: 50-75%; 4: >75%). O estudo foi realizado por 8 semanas. Os dados expressos em mediana e percentis (25 %; 75 %).

Houve uma diferença significativa entre os grupos com lesão renal (DOX-PAD e DOX-CUR) para a avaliação do escore para vimentina de lesão túbulo-intersticial ($p=0,0015$), com atenuação da marcação no tecido renal do grupo tratado com a droga vegetal *C. longa* (**Figura 24**).

Figura 24 - Escore de imunomarcção para vimentina no compartimento túbulo-intersticial do córtex renal

Houve diferença significativa entre os grupos tratados com doxorrubicina e alimentados com ração padrão (DOX-PAD) e alimentados com *C. longa* (DOX-CUR) com ***** $p < 0,0015$ também houve diferença com seus controles (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0001$). Houve diferença entre o grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR) e os controles SAL-PAD (** $p = 0,0005$) e SAL-CUR (* $p = 0,0003$).

4.20 Células ED-1⁺

Exemplos da marcação de células ED-1⁺ por IH em tecido renal são mostrados na **Figura 25**, e os resultados, na **Tabela 9**.

Figura 25 - Cortes histológicos com imunomarcagem para células ED-1⁺

(a)- animal controle (SAL-PAD); (b)- animal tratado com doxorubicina e alimentado com ração padrão (DOX-PAD); (c)- animal tratado com doxorubicina e alimentado com ração contendo *C. longa* (DOX-CUR). Barra indica 50 µm. O tratamento foi realizado por 8 semanas. Observar a presença de maior número de células ED-1⁺ nos cortes (b) e (c), entretanto, nota-se menor número de células no corte (c) do animal tratado com *C. longa* (DOX-CUR).

Percebemos um aumento na expressão de células ED-1⁺ na região glomerular e túbulo-intersticial do córtex renal dos ratos tratados com DOX.

Tabela 9 - Número de células ED-1⁺ no compartimento glomerular e túbulo-intersticial do córtex renal

Grupo	Células ED-1 ⁺ glomerular	Células ED-1 ⁺ túbulo-intersticial
SAL-PAD	1,539 (1,32; 1,74)	11,62 (9,24; 12,9)
SAL-CUR	1,571 (1,2; 1,849)	11,64 (9,32; 12,64)
DOX-PAD	3,264 (2,695; 4,496)	53,76 (33,84; 85,22)
DOX-CUR	2,778 (2,169; 3,189)	32,14 (28,2; 39,91)

DOX, doxorubicina; CUR, ração com *C. longa*; SAL, solução salina isotônica; PAD, ração padrão; ED-1⁺, células com imunomarcagem para ED-1. O estudo foi realizado por 8 semanas. Os dados expressos em mediana e percentis (25 %; 75 %).

Houve uma diferença significativa entre os grupos com lesão renal DOX-PAD e DOX-CUR para o número de células ED-1⁺ quando avaliado o compartimento túbulo-intersticial ($p=0,0110$) com menor número de células no grupo tratado com a droga vegetal de *C. longa*, sugerindo uma atenuação do processo inflamatório com o uso da droga vegetal, entretanto não houve diferença significativa entre esses mesmos dois grupos quando levado em consideração o número de células ED-1⁺ na região glomerular ($p=0,1425$) sugerindo um processo inflamatório mais acentuado na região túbulo-intersticial se comparado a região glomerular (**Figura 26 e Figura 27**).

Figura 26 - Número de células ED-1⁺ por glomérulo

Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com doxorrubicina e alimentados com ração padrão (DOX-PAD) e alimentados com *C. longa* (DOX-CUR) com $p=0,1425$ mas houve diferença com seus controles (**** $p<0,0001$; *** $p<0,0001$). Também houve diferença entre o grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR) e os controles SAL-PAD (** $p=0,0049$) e SAL-CUR (* $p=0,0035$).

Figura 27 - Número de células ED-1⁺ na região túbulo-intersticial por campo de 0,245mm²

Houve diferença significativa entre os grupos tratados com doxorrubicina e alimentados com ração padrão (DOX-PAD) e alimentados com *C. longa* (DOX-CUR) com **** $p=0,0110$ houve também diferença com seus controles (**** $p<0,0001$; *** $p<0,0001$). Também houve diferença entre o grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR) e os controles SAL-PAD (** $p=0,0072$) e SAL-CUR (* $p=0,0055$).

Discussão

---

5 DISCUSSÃO

Após 8 semanas de acompanhamento, nosso estudo confirmou a hipótese de que a administração oral da droga vegetal de *Curcuma longa* a animais com lesão renal induzida por doxorubicina reduziu a inflamação do tecido renal, avaliada através dos mediadores inflamatórios urinários MCP-1 e TGF- β , e também através de imunomarcações para desmina, vimentina e células ED-1⁺; entretanto, não foi confirmada a hipótese de redução da albuminúria nesses animais.

O modelo animal foi semelhante ao descrito na literatura (BERTANI et al., 1982, 1986; SILVA et al., 2001), com albuminúria aparecendo logo nas primeiras semanas após a administração da doxorubicina. Nos grupos doentes (DOX-PAD e DOX-CUR) não houve alteração da função renal, estimada pela creatinina sérica, mas houve queda da albumina plasmática e elevação do colesterol.

Houve diminuição do processo inflamatório no tecido renal dos animais doentes tratados com *C. longa* (DOX-CUR) quando comparado com os animais doentes não tratados (DOX-PAD); isso foi demonstrado por diversas análises, discutidas a seguir.

Menor expressão dos níveis urinários dos marcadores inflamatórios MCP-1 e TGF- β . O MCP-1 é uma quimiocina, chamada de CCL2 em humanos, que recruta monócitos e macrófagos, atuando na progressão da lesão túbulo-intersticial renal. O TGF- β promove fibrose tecidual. Está bem estabelecida, na literatura, a relação entre a expressão urinária destes marcadores com a expressão no tecido renal (DE MURO et al., 2004; KIM; TAM, 2011). Em nosso estudo, no caso do MCP-1, a redução foi mais expressiva a ponto dos níveis urinários de MCP-1/creatinina do grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR) ter sido semelhante à dos grupos controles SAL-PAD e SAL-CUR. Tais achados sugerem um menor processo inflamatório no tecido renal do grupo tratado com a *C. longa*.

Atenuação na imunomarcação para desmina. A desmina é um componente do citoesqueleto, considerada como um marcador sensível para

detecção da lesão dos processos podais glomerulares. Nossos resultados sugerem, então, menor lesão glomerular no grupo tratado com *C. longa*.

Atenuação na imunomarcação para vimentina. A vimentina marcada nas células dos túbulos renais é sugestiva de lesão tubular recente. Assim, nossos resultados sugerem menor lesão do interstício renal do grupo tratado com a droga vegetal.

Menor número de células ED-1⁺ no tecido renal. O anticorpo monoclonal contra ED-1 marca na IH os macrófagos e monócitos presentes no tecido renal, mostrando o processo inflamatório local. Tivemos em nosso estudo uma menor quantidade de células ED-1⁺ na região túbulo-intersticial do córtex renal dos animais com lesão renal e tratados com *C. longa* (DOX-CUR) quando comparados aos não tratados (DOX-PAD). O mesmo não ocorreu quando analisamos o número de células ED-1⁺ no compartimento glomerular. Este achado sugere que houve processo inflamatório mais intenso no compartimento tubular do que no glomerular. O achado de menor osmolalidade urinária no grupo com a lesão renal provocada pela DOX (DOX-CUR) quando comparado ao grupo saudável (SAL-CUR) reforça o achado de que houve lesão túbulo-intersticial com perda de capacidade de concentração tubular.

Em relação ao tecido renal, a inflamação participa ativamente dos mecanismos de progressão da DRC. Nosso experimento mostrou que o tecido renal dos animais doentes tratados com *C. longa* (DOX-CUR), além de estarem menos inflamados, também apresentavam menor lesão tecidual, com atenuação da glomeruloesclerose, da fibrose intersticial e da atrofia tubular, se comparados ao grupo doente não tratado com *C. longa* (DOX-PAD). Isso ocorreu tanto no compartimento glomerular como no túbulo-intersticial.

Nos grupos com lesão renal (DOX-PAD e DOX-CUR), a albuminúria manteve-se elevada durante as oito semanas e somente na oitava semana houve queda da proteinúria no grupo tratado com *C. longa* (DOX-CUR). A queda não foi significativa quando comparada ao seu grupo controle (DOX-PAD), e a proteinúria ainda se manteve elevada ao fim do experimento. A escolha de oito semanas para o experimento foi feita para avaliar os animais no período de menor lesão tecidual do modelo induzido por DOX, ou seja, antes da evolução para GESF global.

Nenhum dos modelos animais de síndrome nefrótica que conhecemos (SIMIC; TABATABAEIFAR; SCHAEFER, 2013) reproduz a GNLM. O modelo da doxorubicina apresenta proteinúria maciça, hipoalbuminemia, dislipidemia e pouca lesão histológica nas primeiras 8 semanas de acompanhamento. A partir deste período, o modelo costuma evoluir com lesões mais extensas no tecido renal, evolução para GESF e DRC (OKUDA et al., 1986), além disso, a glomerulopatia que causa proteinúria no modelo por DOX é secundária a nefrotoxicidade, induzindo a apoptose celular, mecanismo diferente da origem da proteinúria na GNLM e que poderia dificultar a ação da droga vegetal. Dessa maneira não conseguimos comprovar a redução da albuminúria no modelo estudado, mas esse desfecho não poderia ser transposto para a GNLM.

Por outro lado, o mecanismo de lesão renal provocado pela DOX envolve participação do sistema imune, provavelmente de mediadores linfomonocitários, incluindo TNF- α (AMORE et al., 1996). Isto poderia, pelo menos em parte, explicar os efeitos protetores e terapêuticos da *C. longa* neste modelo. Como a GNLM possui forte base imunológica, podemos especular que a *C. longa* poderia ser útil no tratamento destes pacientes, se não na redução da proteinúria, pelo menos na atenuação da inflamação renal.

Atualmente, já está comprovada a eficácia da *C. longa* como medicamento anti-inflamatório, principalmente na área ortopédica (KUPTNIRATSAIKUL et al., 2014). Além disso, ela também está sendo utilizada nos pacientes portadores de diabetes melito tipo 2 para redução do risco aterogênico (CHUENGSAARN et al., 2014). Em modelos animais, apresenta atividade anti-inflamatória em tecido cardíaco (TANWAR et al., 2010; VENKATESAN, 1998) e pulmonar (LIU et al., 2012).

No tecido renal, encontramos poucos estudos que avaliaram a atividade da *C. longa* via oral, em modelos semelhantes de lesão renal.

O estudo de Mohamad et al. (MOHAMAD et al., 2009) se diferenciou do nosso pois utilizou extrato concentrado de *C. longa* (200 mg/kg), ao invés de pó de raiz seca (droga vegetal), de maneira profilática, 10 dias antes da DOX, mantendo diariamente durante todo o estudo. O tratamento com extrato de *C. longa* resultou em redução significativa da proteinúria, da albuminúria, da peroxidação lipídica e de marcadores de estresse oxidativo no tecido renal. É importante notar que, neste estudo, o componente majoritário do extrato de *C.*

longa foi a β -turmerona, o que é diferente da maioria dos trabalhos na literatura, onde o componente majoritário são os curcuminoides (MOHAMAD et al., 2009).

Utilizando o mesmo modelo de lesão renal induzida por DOX, Venkatesan et al estudaram os efeitos da curcumina (200 mg/kg, via oral, 7 dias antes da DOX, diariamente durante todo o estudo). O pré-tratamento com curcumina resultou em proteção renal, com menor proteinúria, menor albuminúria, menor grau de hipoalbuminemia e de hiperlipidemia. A curcumina também levou a menor excreção urinária de N-acetil- β -D-glucosaminidase (um marcador de lesão tubular renal), de fibronectina, de glicosaminoglicanas e melhora na taxa de filtração glomerular. A curcumina ainda levou a supressão do estresse oxidativo no tecido renal da nefropatia induzida por DOX (VENKATESAN; PUNITHAVATHI; ARUMUGAM, 2000).

Outro estudo foi o de Sharma et al. (SHARMA; KULKARNI; CHOPRA, 2006) em que foi testada a *C. longa* em forma de suspensão, em ratos previamente diabéticos avaliando a redução do estresse oxidativo e da disfunção renal. Neste estudo, a administração prolongada de curcumina (15 ou 30 mg/kg, via oral, 4 semanas depois da indução do diabetes com estreptozocina) resultou em atenuação da disfunção renal e do estresse oxidativo.

Ainda um quarto estudo avaliou a atenuação da inflamação renal em ratos que receberam previamente injeção com curcumina (1 ou 5 mg/kg/dia), 3 dias antes da administração de lipopolissacarídeo, avaliando, após 6 horas, a atenuação da produção, ativação ou liberação de MCP-1, ROS e NF- κ B (ZHONG et al., 2011).

Todos estes trabalhos que citamos comprovam e apoiam nossos resultados de que a *C. longa* possui um ótimo efeito protetor renal contra lesões induzidas. Entretanto, este é o primeiro trabalho, até onde sabemos, que avaliou a eficácia terapêutica da *C. longa*, administrada após a injeção de DOX, via oral e em forma de droga vegetal (pó da raiz seca) em um modelo animal de nefropatia induzida por doxorubicina. Além do efeito terapêutico que observamos, a adição da droga vegetal de *C. longa* à ração não resultou em nenhum efeito adverso observável.

Os resultados nos encorajam a planejar um estudo clínico para investigar a eficácia da *C. longa* no tratamento da GNLM em pacientes. Podemos especular que a *C. longa* pode ser útil inclusive em outras síndromes que cursam com proteinúria, já que a redução da inflamação do tecido renal poderia levar a redução na velocidade da progressão da DRC, sendo necessário mais estudos com a droga para estes fins.

Caso a *C. longa* seja eficaz no tratamento da GNLM em crianças, poderia representar uma mudança significativa no tratamento da doença, limitando o uso de corticosteroides aos casos não responsivos à droga vegetal ou a utilização isolada da *C. longa* para a manutenção da remissão nos casos com dependência do corticoide. Isto poderia, sem dúvida, limitar os efeitos adversos do tratamento em pacientes do mundo todo, sem aumentar os custos com o tratamento.

Nosso estudo apresenta, como limitações: (a) o uso do modelo de nefropatia induzida por doxorrubicina, que não é um modelo de GNLM, limitando a validade externa do estudo, mas um modelo totalmente fiel à doença não está disponível; (b) a utilização de uma única dose da *C. longa*, sem a realização de um estudo dose-resposta, mas acreditamos que isto possa ser feito posteriormente, não invalidando nossos achados; e (c) ausência de um grupo controle com tratamento padrão para SN (corticosteroide oral).

Em conclusão, a administração da droga vegetal de *C. longa*, misturada à ração de ratos com lesão renal induzida por doxorrubicina, após oito semanas, resultou em redução da excreção urinária de marcadores de inflamação renal MCP-1 e TGF- β , além da expressão tecidual de marcadores de lesão renal desmina e vimentina, e do número de células ED-1⁺ (macrófagos e monócitos), sugerindo um efeito anti-inflamatório renal.

Referências

---

6 REFERÊNCIAS

AFTAB, N.; VIEIRA, A. Antioxidant activities of curcumin and combinations of this curcuminoid with other phytochemicals. **Phytother Res**, v. 24, n. 4, p. 500–502, 2010.

AKCHURIN, O. M.; KASKEL, F. Update on Inflammation in Chronic Kidney Disease. **Blood Purif**, v. 39, n. 1–3, p. 84–92, 2015.

AMIRGHOFRAN, Z. Herbal medicines for immunosuppression. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 11, n. 2, p. 111–9, jun. 2012.

AMORE, A. et al. Adriamycin-induced proteinuria in nude mice: an immune-system-mediated toxic effect. **Nephrol Dial Transplant**, v. 11, n. 6, p. 1012–1018, 1996.

ANVISA - COMISSÃO DA FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira**. 1a. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2016.

ARAYA, C. et al. T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. **Pediatr Nephrol**, v. 24, n. 9, p. 1691–1698, 2009.

BALAJI, S.; CHEMPAKAM, B. Toxicity prediction of compounds from turmeric (*Curcuma longa* L). **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 10, p. 2951–2959, out. 2010.

BATISTA MASSENO, A. P. et al. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 1, p. 51–57, 2009.

BAZZANO, T. et al. Renal biomarkers of male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal ischemia and reperfusion. **Acta Cir Bras**, v. 30, n. 4, p. 277–288, abr. 2015.

BERTANI, T. et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. **Lab Invest**, v. 46, n. 1, p. 16–23, 1982.

BERTANI, T. et al. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. **Kidney Int**, v. 30, n. 4, p. 488–496, 1986.

BISHT, S.; MAITRA, A. Systemic delivery of curcumin: 21st century solutions for an ancient conundrum. **Curr Drug Discov Technol**, v. 6, n. 3, p. 192–9, set. 2009.

BLUMENTHAL, M. (ED.). **The Complete German Commission E**

Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. 9th. ed. Massachusetts: American Botanical Council, 1998.

BRASIL. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.** Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira.** 5a. Edição ed. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira.** Brasília: ANVISA, 2011.

BUSH, A.; SAGLANI, S. Management of severe asthma in children. **Lancet**, v. 376, n. 9743, p. 814–825, 2010.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc Cult**, v. 55, p. 37–39, 2003.

CARVALHO, A. C. B.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga forma de utilização de plantas medicinais. **Brasilia Med.**, v. 48, n. 2, p. 219–237, 2010.

CHUENG SAMARN, S. et al. Reduction of atherogenic risk in patients with type 2 diabetes by curcuminoid extract: a randomized controlled trial. **J Nutr Biochem**, v. 25, p. 144–50, 2014.

COUSER, W. G. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 13 Suppl 1, p. 10–5, 1998.

D'AGATI, V. D.; KASKEL, F. J.; FALK, R. J. Focal Segmental Glomerulosclerosis. **N Engl J Med**, v. 365, n. 25, p. 2398–2411, 22 dez. 2011.

DE MURO, P. et al. Urinary transforming growth factor-beta 1 in various types of nephropathy. **Pharmacol Res**, v. 49, n. 3, p. 293–298, mar. 2004.

DONADELLI, R. et al. Protein traffic activates NF-kB gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation. **Am J Kidney Dis**, v. 36, n. 6, p. 1226–1241, dez. 2000.

EDDY, A. A. Molecular basis of renal fibrosis. **Pediatr Nephrol**, v. 15, n. 3–4, p. 290–301, 2000.

EDDY, A. A.; SYMONS, J. M. Nephrotic syndrome in childhood. **Lancet**, v. 362, n. 9384, p. 629–639, 2003.

ELIE, V. et al. Physiopathology of idiopathic nephrotic syndrome: lessons from glucocorticoids and epigenetic perspectives. **Pediatr Nephrol**, v. 27, n. 8, p. 1249–1256, ago. 2012.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FLOEGE, J. et al. Markers of complement-dependent and complement-independent glomerular visceral epithelial cell injury in vivo. Expression of antiadhesive proteins and cytoskeletal changes. **Lab Invest**, v. 67, n. 4, p. 486–497, 1992.

GIPSON, D. S. et al. Management of childhood onset nephrotic syndrome. **Pediatrics**, v. 124, n. 2, p. 747–757, 2009.

GRONE, H. J. et al. Coexpression of keratin and vimentin in damaged and regenerating tubular epithelia of the kidney. **Am J Pathol**, v. 129, n. 1, p. 1–8, 1987.

GRUENWALD, J. (ED.). **Physician's Desk Reference (PDR) for Herbal Medicines**. 4th. ed. Connecticut: Thomson, 2007.

HARRIS, R. C.; NEILSON, E. G. Toward a Unified Theory of Renal Progression. **Annu Rev Med**, v. 57, n. 1, p. 365–380, fev. 2006.

HODSON, E. M.; ALEXANDER, S. I. Evaluation and management of steroid-sensitive nephrotic syndrome. **Curr Opin Pediatr**, v. 20, n. 2, p. 145–150, 2008.

HOGAN, J.; RADHAKRISHNAN, J. The Treatment of Minimal Change Disease in Adults. **J Am Soc Nephrol**, v. 24, n. 5, p. 702–711, 1 maio 2013.

JAGETIA, G. C.; AGGARWAL, B. B. “Spicing up” of the immune system by curcumin. **J Clin Immunol**, v. 27, n. 1, p. 19–35, jan. 2007.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M.; SAKARIAH, K. K. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 13, p. 3668–3672, 2002.

JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. **Altern Med Rev**, v. 14, n. 2, p. 141–53, jun. 2009.

KERJASCHKI, D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. **J Clin Invest**, v. 108, n. 11, p. 1583–7, 2001.

KIM, M. J.; TAM, F. W. K. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 in renal disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 23–24, p. 2022–30, 20 nov. 2011.

KIM, Y. S. et al. Curcumin attenuates inflammatory responses of TNF-

alpha-stimulated human endothelial cells. **J Cardivasc Pharmacol**, v. 50, n. 1, p. 41–9, jul. 2007.

KRISHNARAJU, A. V et al. Safety and toxicological evaluation of demethylatedcurcuminoids; a novel standardized curcumin product. **Toxicol Mech Methods**, v. 19, n. 6–7, p. 447–60, set. 2009.

KUPTNIRATSAIKUL, V. et al. Efficacy and safety of Curcuma domestica extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis: A multicenter study. **J Altern Complement Med**, v. 9, p. 451–458, 2014.

LEE, H. S. Antiplatelet property of Curcuma longa L. rhizome-derived ar-turmerone. **Bioresour Technol**, v. 97, n. 12, p. 1372–1376, ago. 2006.

LEE, V. W. S.; HARRIS, D. C. H. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. **Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 30–8, jan. 2011.

LIU, K. et al. The preventative role of curcumin on the lung inflammatory response induced by cardiopulmonary bypass in rats. **J Surg Res**, v. 174, n. 1, p. 73–82, 2012.

LOMBEL, R. M.; GIPSON, D. S.; HODSON, E. M. Treatment of steroid-sensitive nephrotic syndrome: new guidelines from KDIGO. **Pediatr Nephrol**, v. 28, n. 3, p. 415–426, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (Rattus novergicus linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia plena**, v. 8, n. 2003, p. 1–6, 2013.

MICUCCI, M. et al. Curcuma longa L. as a therapeutic agent in intestinal motility disorders. 2: Safety profile in mouse. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80925, 18 nov. 2013.

MIZUTANI, H. et al. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences**, v. 76, n. 13, p. 1439–1453, 11 fev. 2005.

MOHAMAD, R. H. et al. The Role of Curcuma longa Against Doxorubicin (Adriamycin)-Induced Toxicity in Rats. **J Med Food**, v. 12, n. 2, p. 394–402, 1 abr. 2009.

NAZAM ANSARI, M.; BHANDARI, U.; PILLAI, K. K. Protective role of

curcumin in myocardial oxidative damage induced by isoproterenol in rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 26, n. 12, p. 933–8, 2007.

OBERG, B. P. et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. **Kidney Int**, v. 65, n. 3, p. 1009–1016, mar. 2004.

OH, S. W. et al. Curcumin attenuates allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice through NF-kappaB inhibition. **J Ethnopharmacol**, v. 136, n. 3, p. 414–421, 2011.

OKUDA, S. et al. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. **Kidney Int**, v. 29, n. 2, p. 502–510, 1986.

PATIL, B. S. et al. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. **J Agric Food Chemo**, v. 57, n. 18, p. 8142–60, 23 set. 2009.

PECOITS-FILHO, R.; SYLVESTRE, L. C.; STENVINKEL, P. Chronic kidney disease and inflammation in pediatric patients: from bench to playground. **Pediatr Nephrol**, v. 20, n. 6, p. 714–720, 26 jun. 2005.

PEREIRA, W. D. F. et al. The role of the immune system in idiopathic nephrotic syndrome: a review of clinical and experimental studies. **Inflamm Res**, v. 63, n. 1, p. 1–12, 2014.

PEREIRA, W. D. F. et al. The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents: an update. **Inflamm Res**, v. 64, n. 5, p. 287–301, 2015.

SAAD, G. DE A. et al. **Fitoterapia Contemporânea: Tradição e Ciência na Prática Clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SAKURAI, R. et al. Curcumin protects the developing lung against long-term hyperoxic injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 305, n. 4, p. L301-11, 2013.

SHALHOUB, R. J. Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function. **Lancet**, v. 2, n. 7880, p. 556–560, 1974.

SHARMA, S.; KULKARNI, S. K.; CHOPRA, K. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 10, p. 940–5, out. 2006.

SHIH, W.; HINES, W. H.; NEILSON, E. G. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. **Kidney Int**, v. 33, n. 6, p.

1113–8, jun. 1988.

SILVA, C. G. A. et al. Tubular cell lesion, albuminuria, and renal albumin handling in rats treated with adriamycin. **Ren Fail**, v. 23, n. 5, p. 693–703, 2001.

SIMIC, I.; TABATABAEIFAR, M.; SCHAEFER, F. Animal models of nephrotic syndrome. **Pediatr Nephrol**, v. 28, n. 11, p. 2079–2088, 2013.

SOARES, C. M. et al. Predictive factors of progression to chronic kidney disease stage 5 in a predialysis interdisciplinary programme. **Nephrol Dial Transplant**, v. 24, n. 3, p. 848–855, 8 out. 2009.

TAMAKI, K. et al. TGF-beta 1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis of adriamycin nephropathy. **Kidney Int**, v. 45, n. 2, p. 525–536, fev. 1994.

TANWAR, V. et al. Curcumin protects rat myocardium against isoproterenol-induced ischemic injury: attenuation of ventricular dysfunction through increased expression of Hsp27 along with strengthening antioxidant defense system. **J Cardivasc Pharmacol**, v. 55, n. 4, p. 377–84, 2010.

VAN DEN BRANDEN, C. et al. Renal antioxidant enzymes and fibrosis-related markers in the rat adriamycin model. **Nephron**, v. 86, n. 2, p. 167–175, 2000.

VENKATESAN, N. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. **British J Pharmacol**, v. 124, n. 3, p. 425–427, 1998.

VENKATESAN, N.; PUNITHAVATHI, D.; ARUMUGAM, V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. **British J Pharmacol**, v. 129, n. 2, p. 231–4, jan. 2000.

VIANNA, H. R. et al. Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. **J Bras Nefrol**, v. 33, n. 3, p. 351–364, 2011.

VIEDT, C. et al. MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-kappaB and activating protein-1. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 6, p. 1534–1547, 2002.

WENDERFER, S. E. Can inhibition of proteasomes or NF-kappaB help control idiopathic nephrotic syndrome? **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, n. 5, p. 1698–1701, 30 abr. 2012.

WHO. **Declaração de alma-ata**. Conferencia Internacional de Cuidados Primarios. **Anais...**Geneva: 1978

WHO. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva:

1999

WONGCHAROEN, W. et al. Effects of curcuminoids on frequency of acute myocardial infarction after coronary artery bypass grafting. **Am J Cardiol**, v. 110, n. 1, p. 40–4, 2012.

WONGCHAROEN, W.; PHROMMINTIKUL, A. The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. **Int J Cardiol**, v. 133, n. 2, p. 145–151, 2009.

YAMAMOTO, T. et al. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. **Kidney Int**, v. 45, n. 3, p. 916–927, 1994.

YANG, C. et al. Protective effect of curcumin against cardiac dysfunction in sepsis rats. **Pharm Biology**, v. 51, n. 4, p. 482–7, 2013.

YEH, C. H. et al. Inhibition of NFkappaB activation with curcumin attenuates plasma inflammatory cytokines surge and cardiomyocytic apoptosis following cardiac ischemia/reperfusion. **J Surg Res**, v. 125, n. 1, p. 109–116, 2005.

ZHANG, L. et al. Demethoxycurcumin, a natural derivative of curcumin attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF-kappaB signaling pathways in N9 microglia induced by lipopolysaccharide. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 3, p. 331–338, 2010.

ZHONG, F. et al. Curcumin attenuates lipopolysaccharide-induced renal inflammation. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 2, p. 226–32, 2011.

7 ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 057/2014, sobre o projeto intitulado “*Avaliação do uso de extratos de Curcuma longa L. no tratamento da síndrome nefrótica de lesões mínimas em um modelo animal*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Fábio Carmona** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 30 de março de 2015.

We certify that the protocol n° 057/2014, entitled “*Evaluation of the use of Curcuma longa L. in the treatment of minimal change nephrotic syndrome in an animal model*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 03/30/2015.

Ribeirão Preto, 30 de março de 2015.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP

Apêndices

---

8 APÊNDICE I – ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Phytomedicine

Contact us
Help ?

Username: carmona@fmrp.usp.br
Switch To: Author Go to: [My EES Hub](#)

Maintenance outage on 19 February 2017 [...more](#)
Scopus access for Editors and Reviewers [...more](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Version: EES 2017.1

Submissions Being Processed for Author Fabio Carmona, MD, PhD

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Evaluation of oral powdered dried rhizomes of <i>Curcuma longa</i> L. in the treatment of doxorubicin-induced kidney injury in an animal model	Feb 13, 2017	Feb 13, 2017	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

Evaluation of oral powdered dried rhizomes of *Curcuma longa* L. in the treatment of doxorubicin-induced kidney injury in an animal model

Authors: Enzo Ricardo Russo^a, Inalda Facincani^a, Terezila Machado Coimbra^a, Ana Maria Soares Pereira^b, Katia Cristiane Nakazato, Fabio Carmona^{a,*}

Affiliations: ^a Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ^b Department of Plant Biotechnology, University of Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto, SP, Brazil.

* **Corresponding author:** Fabio Carmona, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil - Tel: + 55 16 36022477- E-mail address: carmona@fmrp.usp.br

ABSTRACT

Background: Curcumin is a polyphenol present in the rhizome of the species *Curcuma longa* L., which has been used for centuries as an anti-inflammatory remedy in Asian medicine. Idiopathic nephrotic syndrome is classically treated with corticosteroids, a potent anti-inflammatory and immunosuppressive class. The treatment, however, can cause serious adverse effects.

Objectives: This study was designed to evaluate the anti-inflammatory and anti-proteinuric effects of *C. longa*, as powdered dried rhizomes, in renal injury induced by doxorubicin.

Study design: This is an *in vivo* experimental study.

Methods: The anti-inflammatory and anti-proteinuric effects of *C. longa* were evaluated in four groups of Wistar rats: two groups with intravenous doxorubicin-induced kidney injury (3.5 mg/kg), one fed with standard food and another with standard food mixed with *C. longa* (5 mg/g). Two other control groups without kidney injury were fed, one with standard food and one with *C. longa* in food. Urine samples were collected for albuminuria every 2 weeks. After 8 weeks, the animals were anesthetized and blood was collected for measurement of serum creatinine, albumin and osmolality. In the urine samples, measurements of albuminuria, osmolality and inflammatory mediators as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and transforming growth factor *beta* (TGF- β) were done. Renal tissue was collected for optical microscopy and immunohistochemistry for desmin, vimentin and ED-1 positive cells.

Results: After the 8th week of follow-up, treatment with *C. longa* significantly attenuated the excretion of urinary MCP-1 and TGF- β , and significantly attenuated immunostaining for desmin, vimentin and ED-1⁺ cells in rats with doxorubicin-induced kidney injury.

Conclusion: The results suggest that the use of *C. longa* for 8 weeks in an experimental model of nephrotic syndrome does not reduce albuminuria, but leads to a significant decrease in urinary inflammatory markers MCP-1 and TGF- β , and decreases immunostaining for desmin, vimentin and ED-1⁺ cells kidneys tissues.

Keywords: nephrotic syndrome, animal model, herbal medicine, *Curcuma longa*, doxorubicin, Zingiberaceae.

Abbreviations: ACR, albumin/creatinine ratio; *C. longa*, *Curcuma longa*; CKD, chronic kidney disease; DOX, doxorubicin; DOX-CUR, doxorubicin-induced group and fed with *C. longa*-mixed food; DOX-PAD, doxorubicin-induced group and fed with standard food; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FSGS, focal segmental glomerulosclerosis; IgG, immunoglobulin G; MCD, minimal change disease; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NF- κ B, nuclear factor *kappa*-B; PBS, phosphate-buffered saline; PMSF, Phenylmethanesulfonylfluoride; SAL-CUR, saline-induced group and fed with *C. longa*-mixed food; SAL-PAD saline-induced group and treated with standard food; TGF- β , transforming growth factor beta; UNAERP, University of Ribeirão Preto; USP, University of São Paulo.

INTRODUCTION

Nephrotic syndrome (NS) is a set of signs and symptoms characterized by proteinuria, hypoalbuminemia and edema. Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is the main cause of NS in adults, with a prevalence of around 40% (D'Agati et al., 2011). Minimal change disease (MCD) is the leading cause of NS in children, and accounts for 10-25% of cases in adults (Hogan and Radhakrishnan, 2013). The main therapy is long-term use of corticosteroids in both adults and children. In patients who have contraindication to corticosteroids or in those who do not respond, other immunosuppressive agents as cyclophosphamide, cyclosporin, mycophenolate mofetil and tacrolimus have been used.

Some studies show the importance of the immune system in the development and maintenance of NS, mainly associated with an abnormal response of the T-lymphocytes. In addition, there is interference of circulating factors (Araya et al., 2009; Shalhoub, 1974). Albuminuria leads to expression of chemokines in the proximal tubule through a mechanism dependent of nuclear factor *kappa*-B (NF- κ B) activation (Donadelli et al., 2000). We know that corticosteroids act probably on attenuation of NF- κ B activation and is the likely responsible for the clinical improvement of patients with idiopathic NS (Wenderfer, 2012). The persistent chronic, low-grade kidney inflammation is an essential component of chronic kidney disease (CKD) (Akchurin and Kaskel, 2015).

Most cases will respond to treatment with corticosteroids. However, long-term use of corticosteroids can cause undesirable side effects, such as growth retardation in children. Therefore, it is necessary to develop new drugs for treatment of NS.

One of the most promising anti-inflammatory and immunosuppressive molecules is curcumin (Amirghofran, 2012; Jagetia and Aggarwal, 2007), a polyphenol present in the rhizome of *Curcuma longa* L. ("turmeric", Zingiberaceae), which has been used for centuries as anti-inflammatory medicine in Asia.

Our hypothesis was that, in an animal model of doxorubicin-induced injury, as a model for NS, the use of *C. longa*, mixed in food, results in reduction of albuminuria and renal inflammation when compared to standard food.

MATERIAL AND METHODS

Male, 6-8 weeks-old Wistar rats were used, with 220-290 g of body weight, which were kept in boxes containing 3 to 4 rats fed with standard food and offered water *ad libitum*. The assessment of body weight and food intake occurred every two weeks. For the wake-sleep cycle, the rats were exposed to 12 hours of light and 12 hours of dark, at a temperature of 22 °C. Every 2 weeks, the rats were placed in individual metabolic cages, for evaluation of urinary volume and 24-hour albuminuria. The experimental protocol followed the recommendations and is in accordance with the ethical principles of National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and was approved by the local Animal Ethics Committee (protocol number 057/2014 on March 30th, 2015).

Preparation of *Curcuma longa*

Rhizomes of *C. longa*, cultivated in the region of Jardinópolis, São Paulo, Brazil (latitude: 21°01'04", longitude: 47°45'50", altitude: 590 m), were collected, washed, sliced, and dried for 7 days in a circulating-air oven at 45 °C. Dried material was powdered in a knife mill up to 32 mesh particle size. Curcumin and desmethoxycurcumin standards were obtained from the rhizomes following the methods described elsewhere (Jayaprakasha et al., 2002), and validated by spectroscopic methods. Briefly, curcuminoids were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC), obtaining a concentration of 45.31 mg/g (w/w) of curcumin, and 6.94 mg/g (w/w) of desmethoxycurcumin.

Preparation of food

We used standard food (Nuvilab®, Curitiba, Brazil) that was crushed in mill DPM-4 (Nogueira, Itapira, Brazil) with sieve number 2 and mixed with powdered *C. longa* in proportion of 5 mg/g food. This mixture was put in a mixer MA 206 (Marconi, Piracicaba, Brazil) for 10 minutes and then it was pelletized in Rosim 0337 (Rosim, Boa Esperança do Sul, Brazil) to be provided to animals.

Induction protocol of nephrotic syndrome

We used a model of doxorubicin-induced kidney injury as a surrogate for nephrotic syndrome (Bertani et al., 1982; Simic et al., 2013). The renal injury was induced with doxorubicin (Fauldoxo®, Libbs, Embu, Brazil) at 3.5 mg/kg IV through the tail dorsal vein on day zero (D0). The animals were split into four groups, with 9-10 rats each, as follows: **SAL-PAD**: The rats were treated with

saline and received standard food during the treatment period (n = 9); **SAL-CUR**: the rats were treated with saline and received standard food mixed with *C. longa* during the treatment period (n = 10); **DOX-PAD**: the rats were treated with doxorubicin and received standard food during the treatment period (n = 10); **DOX-CUR Group**: The rats were treated with doxorubicin and received standard food mixed with *C. longa* during the treatment period (n = 10).

The animals were weighed every 14 days and the amount of food they were ingesting was measured. In days 14, 28, 42, and 56, the animals were placed in individual metabolic cages for collection of 24-hours urine. In these occasions, the urinary volume was measured and a sample was collected for measurements of urinary albumin and creatinine.

On day 56, the rats were anesthetized with sodium thiopental (40 mg/kg, i.p.) and, after being completely sedated, blood and urine samples were collected. Blood was collected by catheterization of the inferior vena cava for measurement of serum creatinine and osmolality. The animal was kept on a warming plate for cannulation of trachea and bladder. Urine samples were kept frozen at -70 °C for urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and transforming growth factor beta (TGF- β) measurements. The animals were sacrificed and the left kidney collected, sectioned, and fixed in methanol-Carnoy (methacarn) solution for 24 hours, and stored in 70% ethanol. Histological sections were made for optical microscopy and immunolabelling for desmin, vimentin and ED-1⁺ cells.

Determination of serum and urinary tests

Urine samples were preserved by the addition of sodium azide. A sample was separated and stored at -20 °C. Urinary albumin and creatinine measurements were done by immunoturbidimetric and kinetic methods, respectively (2300 Plus Wiener Metrolab, Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina; Wiener Microalbumina Turbitest AA; Wiener Creatinina Cinetica AA). The albumin/creatinine ratio (ACR) was used for the normalization of albuminuria.

In samples collected on day 56, serum and urinary osmolality were estimated by the steam reduction pressure point (Wescor Vapro Pressure Osmometer 5600, Wescor, Puteaux, FR). Serum creatinine was measured by

kinetic method, (2300 Plus Wiener Metrolab, Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina; Wiener Cinetic Creatinine AA).

Urine samples for the determination of MCP-1 and TGF- β were treated immediately with 1 mM of PMSF (*Phenylmethanesulfonylfluoride*). The urinary quantification was done by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using commercial kits Promega and Pierce, respectively (Promega Corporation, Madison, MO, USA and Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). The values of TGF- β and MCP-1 were expressed in picograms of TGF- β or MCP-1 per milligram of creatinine (pg/mg).

Optical Microscopy

The histological sections (3 μ m) were stained with Masson's trichrome. Glomerular lesions were evaluated by scores that reflected the extent of the injury (0: 0-5%; 1: 5-25%; 2: 25-50%; 3: 50-75%; 4: >75%). Interstitial injuries of the renal cortex were evaluated by scores (Shih et al., 1988) 0: normal; 0,5: discrete focal changes; 1: <10% of the cortex; 2: 10-25% of the cortex; 3: 25-75% of the cortex; 4: > 75% of the cortex. These scores were assessed in 50 glomeruli and 20 optical fields (measuring 0.245 mm²/field) of each animal. Mean scores of glomerular and interstitial lesions were calculated for each animal.

Immunohistochemistry

The histological sections (3 μ m) were dewaxed and subjected to immunohistochemistry reaction. The material was incubated with the following primary antibodies: (1) Anti-desmin monoclonal (Dako A/S, Denmark), incubation for 60 min at room temperature (1/100); (2) Anti-vimentin monoclonal (Dako A/S, Denmark), incubation for 60 min at room temperature (1/500); and (3) Anti-ED-1 monoclonal (Serotec, USA), incubation for 60 min at room temperature (1/1.000).

The sections were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with biotinylated secondary antibodies anti-immunoglobulin G (IgG). The product of the reaction was detected with avidin-biotin-peroxidase system (Vector Laboratories, USA) and the color was developed by adding 3,3-diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Company, USA) in the presence of hydrogen peroxide. Non-specific links have been blocked by primary and

secondary antibody dilutions with PBS solution containing bovine albumin (1%). The counterstain was performed with *methylgreen*.

The mean number of ED-1-positive cells per field and per glomerulus for each animal was calculated. For all the immunostainings above, at least 40 fields of 0,245 mm² and 50 glomeruli were analyzed.

Statistical analysis

Comparisons between the groups at a single time point was done with 1-way ANOVA, with Tukey-Kramer test for multiple comparisons. Comparisons between the groups at more than one time point was done with 2-way ANOVA for repeated measurements, with Tukey-Kramer test for multiple comparisons. Values of $p < 0,05$ was considered statistically significant. We used GraphPadPrism 7 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

RESULTS

There was no difference in weight gain between the groups ($p=0,0741$). The average intake of food was not different between the groups ($p=0,6797$). Drug intake was around 400 mg/kg/day, as described in Table 1. There was no significant difference on drug intake between the groups ($p=0,2172$). All groups had normal levels of serum creatinine (Melo et al., 2013), as shown in Table 2.

Every 2 weeks, the animals were placed in metabolic cages and urine specimens were collected for ACR. The data were transformed into logarithm before statistical analysis because not present normal distribution. There was no significant difference between the groups with nephrotic syndrome (DOX-CUR and DOX-PAD) ($p=0,5741$) as described in Figure 1. The serum and urinary osmolality were normal, and there was no statistical difference between DOX-PAD and DOX-CUR groups. There was significant difference between urinary osmolality between SAL-CUR and DOX-CUR ($p=0,0055$) suggesting a minor urinary concentration capacity in the doxorubicin-induced group, as shown in Table 2.

Kidney Inflammation and injury

Urinary MCP-1/creatinine. There is a significant difference between the doxorubicin-induced groups DOX-PAD and DOX-CUR ($p=0,0001$) with MCP-1/creatinine values lower in the DOX-CUR group, suggesting a significant attenuation in the expression of this renal inflammatory mediator in the group treated with the drug. In addition, there was no statistical difference between the

DOX-CUR group and the controls group (vs SAL-PAD $p=0,4863$ and vs SAL-CUR with $p=0,9692$) as described in Figure 2.

Urinary TGF- β /creatinine. There was a significant difference between the groups DOX-PAD and DOX-CUR ($p=0,0264$) with TGF- β /creatinine values lower in the urine of the group DOX-CUR, as shown in Figure 2.

Optical microscopy. The histological study revealed in doxorubicin-treated rats: glomerulosclerosis, tubular light dilation, flattening of the tubular cells with loss of brush border, tubular atrophy and interstitial fibrosis increase. There is a significant difference between the doxorubicin-treated groups DOX-PAD and DOX-CUR, both for the evaluation of glomerular injury score ($p<0,0001$) as the tubule interstitial injury score ($p<0,0001$) with lower scores in DOX-CUR group, shown in figure 3.

Immunohistochemistry. Examples of desmin immunostaining are shown in Figure 4, for vimentin in Figure 5 and ED-1⁺ cells in Figure 6. The analysis shows that there is a significant difference between the doxorubicin-induced groups DOX-PAD and DOX-CUR for the evaluation of the desmin score ($p<0,0001$) (Figure 4) and vimentin ($p=0,0015$) (Figure 5) for glomerular and tubule interstitial injury respectively. The ED-1⁺ cells analysis shows that there are significant differences between DOX-PAD and DOX-CUR groups when assessed interstitial compartment, with fewer cells in the group treated with *C. longa* ($p=0,0110$). However, there is no difference between these groups when considering the glomerular compartment ($p=0,1425$), suggesting a more pronounced inflammatory process in the tubule interstitial compartment (Figure 6).

DISCUSSION

After 8 weeks, our study confirmed the hypothesis that oral administration of powdered rhizomes of *Curcuma longa* to animals with doxorubicin-induced renal injury reduces tissue inflammation, demonstrated by the lower expression of urinary inflammatory mediators MCP-1 and TGF- β , and attenuated immunostaining for desmin, vimentin and ED-1⁺ cells. However, albuminuria was not reduced in these animals.

The animal model we used was similar to that described in the literature (Bertani et al., 1986, 1982; Silva et al., 2001), with albuminuria appearing in the early weeks after administration of doxorubicin.

MCP-1 is a chemokine that recruits monocytes and macrophage. TGF- β has an effect of increasing fibrosis. Urinary concentrations of MCP-1 and TGF- β correlate significantly with tissue expression, and can be used as surrogate markers for tissue inflammation (DE MURO et al., 2004; KIM; TAM, 2011). Our study showed a significant reduction of these inflammatory markers in the *C. longa* treated group (DOX-CUR) when compared to untreated animals (DOX-PAD). MCP-1 reduction was more significant and the DOX-CUR group. In fact, urinary levels of MCP-1/creatinine in DOX-CUR group were similar to the SAL-PAD and SAL-CUR control groups. Such findings suggest a milder inflammation in the renal tissues of the group treated with *C. longa*.

Desmin is a component of the cytoskeleton considered as a sensitive marker of injury in foot processes. Our study suggests less glomerular injury in the group treated with *C. longa*.

The vimentin expression is suggestive of recent or ongoing tubular injury. Our study shows less interstitial injury in the *C. longa*-treated group.

The monoclonal antibody anti-ED-1 marks macrophages and monocytes in immunohistochemistry, showing the local inflammatory process. In our study, we had a smaller number of ED-1⁺ cells in the tubule-interstitial compartment of the sick animals and treated with *C. longa* (DOX-CUR), compared to the untreated group (DOX-PAD). The same did not occur when we analyzed the number of ED-1⁺ cells in the glomerular compartment. This finding suggests that there was a more intense inflammatory process in the tubular compartment than in the glomerular compartment. The finding of lower urinary osmolality in the group with the doxorubicin-induced renal injury (DOX-CUR) when compared to the healthy group (SAL-CUR) reinforces the finding that there was a loss of tubular concentration capacity.

In relation to kidney tissue, inflammation actively participates in the mechanisms of progression of CKD. Our experiment showed that in the kidney tissue of sick animals treated with *C. longa* (DOX-CUR), in addition to being less inflamed, also had less tissue injury, with attenuation of glomerulosclerosis, tubular atrophy and interstitial fibrosis compared to sick, untreated group (DOX-PAD).

In the groups with doxorubicin-induced kidney injury, albuminuria remained high during the eight weeks of the experiment. The choice of eight

weeks for the experiment was made to evaluate the animals during the period of none or mild tissue injury induced by DOX.

The model with doxorubicin leads to massive proteinuria, hypoalbuminemia, hyperlipidemia, and almost no histological lesion in the first 8 weeks. After that, more extensive lesions appear in the kidneys, evolving to FSGS and CKD (Okuda et al., 1986). In addition, the glomerulonephritis that causes albuminuria in the model with DOX is secondary to drug nephrotoxicity, a different mechanism of proteinuria from that seen in human NS. These differences could explain why we did not observe any reduction in albuminuria.

In addition to the therapeutic effect, the addition of *C. longa* to the food resulted in no observable adverse effect to the animals.

C. longa is already used in humans as an anti-inflammatory in various situations, such as in the treatment of osteoarthritis (Kuptniratsaikul et al., 2014), atherogenic risk reduction in patients with type 2 diabetes mellitus (Chuengsamarn et al., 2014) and attenuation of myocardial injury after cardiac surgery (Wongcharoen et al., 2012). In addition, the plant shows protective effects in animal models of myocardial injury (Tanwar et al., 2010; Yang et al., 2013), pulmonary injury (Liu et al., 2012; Sakurai et al., 2013), and renal injury, but, in these studies, *C. longa* was used in different ways. In one study, turmeric extract was administered 10 days prior to the injection of doxorubicin, in a preventive way (Mohamad et al., 2009); in another study, oral suspension of curcumin was used in the reduction of oxidative stress and renal dysfunction in diabetic rats (Sharma et al., 2006); in yet another study, a curcumin solution was injected previously to lipopolysaccharide-injury, showing the reduction of renal MCP-1 e NF- κ B (Zhong et al., 2011).

This is the first study, to the best of our knowledge, that evaluated the therapeutic efficacy of *C. longa*, administered as powdered dried rhizomes in doxorubicin-induced animal model, after induction of injury. This means we investigated the therapeutic, not the prophylactic, effect.

The results encourage us to conduct a clinical trial to investigate the effectiveness of *C. longa* to treat idiopathic NS in human patients. We can speculate that *C. longa* can be also useful in other syndromes with proteinuria, since reducing kidney inflammation could lead to a slower progression to CKD. Of course, more studies are needed to confirm these speculations.

CONCLUSION

The administration of *C. longa*, as powdered dried rhizomes, mixed with food, to rats with doxorubicin-induced renal injury, for eight weeks, resulted in reduction of urinary excretion of markers of renal inflammation MCP-1 and TGF- β , in addition to lower tissue expression markers of renal injury desmin and vimentin, and smaller number of ED-1-positive cells (macrophages and monocytes), suggesting an anti-inflammatory effect in the kidneys.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to the Laboratory of Renal Physiology – FMRP-USP for providing materials and technical assistance to carry out this work.

FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CONFLICTS OF INTEREST

None to declare.

REFERENCES

1. Akchurin, O.M., Kaskel, F., 2015. Update on Inflammation in Chronic Kidney Disease. *Blood Purif.* 39, 84–92.
2. Amirghofran, Z., 2012. Herbal medicines for immunosuppression. *Iran. J. Allergy. Asthma. Immunol.* 11, 111–9. doi:011.02/ijaa.111119
3. Araya, C., Diaz, L., Wasserfall, C., Atkinson, M., Mu, W., Johnson, R., Garin, E., 2009. T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 24, 1691–1698. doi:10.1007/s00467-009-1214-x
4. Bertani, T., Cutillo, F., Zoja, C., Broggin, M., Remuzzi, G., 1986. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int* 30, 488–496.
5. Bertani, T., Poggi, A., Pozzoni, R., Delaini, F., Sacchi, G., Thua, Y., Mecca, G., Remuzzi, G., Donati, M.B., 1982. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 46, 16–23.
6. Chuengsamarn, S., Rattanamongkolgul, S., Phonrat, B., Tungtrongchitr, R., Jirawatnotai, S., 2014. Reduction of atherogenic risk in patients with type 2 diabetes by curcuminoid extract: a randomized controlled trial. *J. Nutr. Biochem.* 25, 144–50. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.09.013
7. D'Agati, V.D., Kaskel, F.J., Falk, R.J., 2011. Focal Segmental

- Glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 365, 2398–2411.
doi:10.1056/NEJMra1106556
8. Donadelli, R., Abbate, M., Zanchi, C., Corna, D., Tomasoni, S., Benigni, A., Remuzzi, G., Zoja, C., 2000. Protein traffic activates NF- κ B gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation. *Am. J. Kidney Dis.* 36, 1226–1241. doi:10.1053/ajkd.2000.19838
  9. Hogan, J., Radhakrishnan, J., 2013. The Treatment of Minimal Change Disease in Adults. *J Am Soc Nephrol* 24, 702–711.
doi:10.1681/ASN.2012070734
  10. Jagetia, G.C., Aggarwal, B.B., 2007. “Spicing up” of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol* 27, 19–35. doi:10.1007/s10875-006-9066-7
  11. Jayaprakasha, G.K., Rao, L.J.M., Sakariah, K.K., 2002. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3668–3672.
doi:10.1021/jf025506a
  12. Kuptniratsaikul, V., Dajpratham, P., Taechaarpornkul, W., Buntragulpoontawee, M., Lukkanapichonchut, P., Chootip, C., Saengsuwan, J., Tantayakom, K., Laongpech, S., 2014. Efficacy and safety of *Curcuma domestica* extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis: A multicenter study. *Clin. Interv. Aging* 9, 451–458.
  13. Liu, K., Shen, L., Wang, J., Dong, G., Wu, H., Shao, H., Jing, H., 2012. The preventative role of curcumin on the lung inflammatory response induced by cardiopulmonary bypass in rats. *J. Surg. Res.* 174, 73–82.
doi:10.1016/j.jss.2010.12.002
  14. Melo, M.G.D., Dória, G.A.A., Serafini, M.R., Araújo, A.A.S., 2013. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Sci. plena* 8, 1–6.
  15. Mohamad, R.H., El-Bastawesy, A.M., Zekry, Z.K., Al-Mehdar, H.A., Al-said, M.G.A.M., Aly, S.S., Sharawy, S.M., El-Merzabani, M.M., 2009. The Role of *Curcuma longa* Against Doxorubicin (Adriamycin)-Induced Toxicity in Rats. *J Med Food* 12, 394–402. doi:10.1089/jmf.2007.0715
  16. Okuda, S., Oh, Y., Tsuruda, H., Onoyama, K., Fujimi, S., Fujishima, M., 1986. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive

- glomerular disease. *Kidney Int* 29, 502–510.
17. Sakurai, R., Villarreal, P., Husain, S., Liu, J., Sakurai, T., Tou, E., Torday, J.S., Rehan, V.K., 2013. Curcumin protects the developing lung against long-term hyperoxic injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305, L301–11. doi:10.1152/ajplung.00082.2013
  18. Shalhoub, R.J., 1974. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet* 2, 556–560.
  19. Sharma, S., Kulkarni, S.K., Chopra, K., 2006. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33, 940–5. doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04468.x
  20. Shih, W., Hines, W.H., Neilson, E.G., 1988. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. *Kidney Int* 33, 1113–8.
  21. Silva, C.G.A., Galli, L.G., Volpini, R.A., Costa, R.S., da Silva, C.G., Coimbra, T.M., 2001. Tubular cell lesion, albuminuria, and renal albumin handling in rats treated with adriamycin. *Ren Fail* 23, 693–703.
  22. Simic, I., Tabatabaeifar, M., Schaefer, F., 2013. Animal models of nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 28, 2079–2088. doi:10.1007/s00467-012-2376-5
  23. Tanwar, V., Sachdeva, J., Golechha, M., Kumari, S., Arya, D.S., 2010. Curcumin protects rat myocardium against isoproterenol-induced ischemic injury: attenuation of ventricular dysfunction through increased expression of Hsp27 along with strengthening antioxidant defense system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 55, 377–84.
  24. Wenderfer, S.E., 2012. Can inhibition of proteasomes or NF-kappaB help control idiopathic nephrotic syndrome? *Nephrol. Dial. Transplant.* 27, 1698–1701. doi:10.1093/ndt/gfs079
  25. Wongcharoen, W., Jai-Aue, S., Phrommintikul, A., Nawarawong, W., Woragidpoonpol, S., Tepsuwan, T., Sukonthasarn, A., Apaijai, N., Chattipakorn, N., 2012. Effects of curcuminoids on frequency of acute myocardial infarction after coronary artery bypass grafting. *Am. J. Cardiol.* 110, 40–4. doi:10.1016/j.amjcard.2012.02.043
  26. Yang, C., Wu, K., Li, S.-H., You, Q., 2013. Protective effect of curcumin against cardiac dysfunction in sepsis rats. *Pharm. Biol.* 51, 482–7.

27. Zhong, F., Chen, H., Han, L., Jin, Y., Wang, W., 2011. Curcumin attenuates lipopolysaccharide-induced renal inflammation. *Biol Pharm Bull* 34, 226–32.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Albumin/creatinine ratio and standard error of the mean. DOX, doxorubicin; CUR, food with *C. longa*; SAL, isotonic saline solution; PAD, standard food.

Figure 2. MCP-1/creatinine and TGF- β /creatinine relation at 56th day. (*p<0,0001; **p<0,0001; ***p<0,0001; +p=0,0264; ++p=0,0002; +++p<0,0001); MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; TGF- β , transforming growth factor beta; DOX, doxorubicin; CUR, food with *C. longa*; SAL, isotonic saline solution; PAD, standard food.

Figure 3. Histological cuts stained with Masson's trichrome of renal cortex (bar indicates 50 μ m); (a)- Control (SAL-PAD); (b)- Doxorubicin-induced animal fed with standard food (DOX-PAD); (c)- Doxorubicin-treated animal fed with food containing *C. longa* (DOX-CUR); (d)- Glomerular injury score. (*p=0,0761; **p=0,0945; ***p<0,0001; ****p<0,0001; *****p<0,0001); (e)- Interstitial injury score (+p=0,0042; ++p=0,0057; +++p<0,0001; ++++p<0,0001; +++++p<0,0001); (DOX, doxorubicin; CUR, food with *C. longa*; SAL, isotonic saline solution; PAD, standard food.

Figure 4. Histological sections with immunolabeling for desmin (bar indicates 50 μ m) (a)- Control (SAL-PAD); (b)- Doxorubicin-induced animal fed with standard food (DOX-PAD); (c)- Doxorubicin-treated animal fed with food containing *C. longa* (DOX-CUR) and Desmin score (*p=0,0235; **p=0,0345; ***p<0,0001; ****p<0,0001; *****p<0,0001).

Figure 5. Histological sections with immunolabeling for vimentin (bar indicates 50 μ m) (a)- Control (SAL-PAD); (b)- Doxorubicin-induced animal fed with standard food (DOX-PAD); (c)- Doxorubicin-treated animal fed with food containing *C. longa* (DOX-CUR) and Vimentin score (*p=0,0003; **p=0,0005; ***p<0,0001; ****p<0,0001; *****p<0,0015).

Figure 6. Histological sections with immunolabeling for ED-1⁺ cells (bar indicates 50 μ m) (a)- Control (SAL-PAD); (b)- Doxorubicin-induced animal fed with standard food (DOX-PAD); (c)- Doxorubicin-treated animal fed with food containing *C. longa* (DOX-CUR); (d)- Glomerular ED-1⁺ cells score (*p=0,0035; **p=0,0049; ***p<0,0001; ****p<0,0001; *****p<0,1425); (e)- Interstitial ED-1⁺ cells score (+p=0,0055; ++p=0,0072; +++p<0,0001; ++++p<0,0001;

++++ $p < 0,0110$); DOX, doxorubicin; CUR, food with *C. longa*; SAL, isotonic saline solution; PAD, standard food.

TABLE LEGENDS

Table 1. Weight gain, food Intake and drug intake

Table 2. Serum creatinine, serum osmolality and urinary osmolality

Figure 1. Albumin/creatinine ratio and standard error of the mean

Figure 2. MCP-1/creatinine and TGF- β /creatinine relation at 56th day

Figure 3. Histological cuts stained with Masson's trichrome of renal cortex

Figure 4. Histological sections with immunolabeling for desmin

Figure 5. Histological sections with immunolabeling for vimentin **Figure 6.** Histological sections with immunolabeling for ED-1⁺ cells

Table 1 –Weight gain, food Intake and drug intake

Group	Weight gain (g)	Feed intake (g/day)	Food intake for <i>C. longa</i> (mg/kg/day)
SAL-PAD	470 (304.1, 572.5)	34.02 (32.57, 39.12)	
SAL-CUR	479 (314.8, 577.4)	36.35 (33.49, 39.35)	382.3 (331.8, 431.2)
DOX-PAD	433 (312.1, 495.7)	35.92 (34.98, 38.63)	
DOX-CUR	436 (315.8, 506.1)	35.98 (32.58, 37.41)	415.9 (352.1, 445.8)

DOX, doxorubicin; CUR, food with *C. longa*; SAL, isotonic saline solution; PAD, standard food. The study was carried out for 8 weeks. The data were expressed as median and interquartile range (p25; p75)

Table 2 –Serum creatinine, serum osmolality and urinary osmolality

Group	Creatinine (mg/dL)	Serum osmolality (mmol/kg)	Urinary osmolality (mmol/kg)
SAL-PAD	0.49 (0.43, 0.54)	302 (300.5, 305.5)	1573 (1365, 1785)
SAL-CUR	0.42 (0.38, 0.43)	299 (297.5, 301)	2057 (1771, 2152)
DOX-PAD	0.40 (0.34, 0.43)	298 (297, 305.5)	1513 (1184, 1946)
DOX-CUR	0.36 (0.26, 0.51)	298.5 (296.5, 300.8)	1193 (912, 1646)

DOX, doxorubicin; CUR, food with *C. longa*; SAL, isotonic saline solution; PAD, standard food. The study was carried out for 8 weeks. The data were expressed as median and interquartile range (p25; p75)