

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO**

GEYSE CRISTINA SILVA DE AGUIAR

**Efeito da curcumina sobre a resposta inflamatória estimulada pelo
lipopolissacarídeo *in vitro* e *in vivo***

**RIBEIRÃO PRETO
2019**

GEYSE CRISTINA SILVA DE AGUIAR

Efeito da curcumina sobre a resposta inflamatória estimulada pelo lipopolissacarídeo *in vitro* e *in vivo*

Dissertação apresentada à Enfermagem da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação Enfermagem Fundamental.

Linha de pesquisa: Doenças infecciosas: problemática e estratégias de enfrentamento

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Angelita Maria Stabile.

RIBEIRÃO PRETO

2019

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.

AGUIAR, Geyse Cristina Silva de

Efeito da curcumina sobre a resposta inflamatória estimulada pelo lipopolissacarídeo *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão Preto, 2019.

63 p.: il.; 30 cm;

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Angelita Maria Stabile

1. Curcumina. 2. Sepsis. 3. Lipopolissacarídeo

AGUIAR, Geysel Cristina Silva de

Efeito da curcumina sobre a resposta inflamatória estimulada pelo lipopolissacarídeo em cultura de macrófagos peritoneais

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação Enfermagem Fundamental.

Aprovado em / /

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ivete Cristina Silva de Aguiar e Adão de Aguiar que sempre me apoiaram e não mediram esforços para tornar meus sonhos em realidade. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por cuidar de mim e sempre mostrar o caminho e a solução nos momentos difíceis;

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Angelita, pela paciência, amizade e incentivo em todos esses anos de orientação desde a iniciação científica em 2012;

Aos meus pais, pelo apoio e por sempre ter a educação como uma prioridade;

Ao meu namorado, Gabriel, pelas sugestões e pela compreensão nos momentos de ausência devido a dedicação a este trabalho;

Ao Marcelo Batalhão, pelo auxílio prestado em todos os experimentos, pela amizade e todos os ensinamentos;

À Patrícia Passaglia, pela amizade, momentos de descontração e apoio;

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma e por ventura não foram citados.

*Nem todo viandante
anda estradas
há mundos submersos
que só o silêncio
da poesia penetra.*

Conceição Evaristo

RESUMO

AGUIAR, G. C. S. de. **Efeito da curcumina sobre a resposta inflamatória estimulada pelo lipopolissacarídeo *in vitro* e *in vivo***. 2019, 63 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A sepse acontece em decorrência da resposta imunológica exacerbada do hospedeiro à infecção que pode ser causada por diversos agentes etiológicos, como bactérias, vírus, protozoários e fungos. Devido a sua alta incidência, a sepse é tida como um problema de saúde mundial com a ocorrência de cerca de 18 milhões de casos anualmente em todo o mundo. Componentes de patógenos, como a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, desencadeiam a liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (NO) objetivando eliminar o patógeno, entretanto, a produção excessiva desses mediadores leva o organismo a um estado de anergia e imunossupressão. A curcumina, substância presente em uma planta tropical denominada *Curcuma Longa L*, é conhecida pelos seus efeitos antitumoral, imunomodulador e antioxidante. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito imunomodulador de uma dispersão sólida de curcumina após estímulo com LPS *in vivo* e *in vitro* em cultura de macrófagos peritoneais. Para atingir o objetivo, foram realizados experimento *in vivo*, nos quais ratos receberam injeção endovenosa de curcumina em duas doses (2 mg/kg e 20 mg/kg) seguida da injeção de LPS (1,5 mg/kg). Quatro horas após a administração de LPS os ratos foram decapitados para coleta do sangue. Para os experimentos *in vitro* foi realizado lavado peritoneal de ratos para coleta dos macrófagos residentes. Esses foram mantidos em cultura em placa de 24 poços e estimulados com curcumina (10^{-5} M e 10^{-7} M) e LPS (1 μ g/ml). O meio de cultura foi coletado 24 horas após o estímulo com LPS. O tratamento da cultura com curcumina resultou em diminuição do acúmulo de nitrito e das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) em relação à cultura tratada com LPS apenas, no entanto, não foi observada alteração na produção de IL-10. Nos estudos *in vivo*, as duas doses de curcumina avaliadas não alteraram a produção de nitrato e lactato nos animais tratados com LPS. O tratamento com curcumina 20 mg/kg mostrou efeito inibidor sobre a produção de TNF- α e IL-6, no entanto, resultou em aumento na concentração de IL-1 β . As duas doses de curcumina avaliadas não alteraram a concentração sérica de IL-10 nos animais tratados com LPS. Nossos resultados mostraram que uma dispersão sólida de curcumina foi capaz de reduzir a produção de citocinas por macrófagos peritoneais e também quando administrada endovenosamente. Esses resultados podem servir como base para a realização de mais estudos *in vivo*, os quais são necessários para compreender o efeito da curcumina sobre a resposta inflamatória durante a endotoxemia e sepse.

Descritores: Curcumina. Sepse. Lipopolissacarídeo.

ABSTRACT

AGUIAR, G. C. S. de. **Effect of curcumin on the inflammatory response stimulated by lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo***. 2019, 63 f. Dissertation (Master) – University of São Paulo at Ribeirão Preto College of Nursing, 2019.

Sepsis occurs as a result of the host's exaggerated immune response to infection that may be caused by a variety of etiological agents, such as bacteria, viruses, protozoa, and fungi. Due to its high incidence, sepsis is considered as a global health problem with the occurrence of about 18 million cases annually around the world. Pathogen components, such as lipopolysaccharide endotoxin (LPS), present on the cell wall of Gram-negative bacteria, trigger the release of inflammatory mediators, such as pro-inflammatory cytokines and nitric oxide (NO), in order to eliminate the pathogen, however, excessive production of these mediators leads the organism to a state of anergy and immunosuppression. Curcumin, a substance in a tropical plant called *Curcuma Longa L.*, is known for its antitumor, immunomodulatory and antioxidant effects. The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of a solid dispersion of curcumin after stimulation with LPS *in vivo* and *in vitro* in culture of peritoneal macrophages. To achieve the goal, *in vivo* experiments were performed in which rats received intravenous injection of curcumin at two doses (2 mg / kg and 20 mg / kg) followed by injection of LPS (1.5 mg / kg). Four hours after administration of LPS the mice were beheaded for collection of blood. *In vitro* experiments were performed peritoneal lavage of rats to collect resident macrophages. These were maintained in 24-well plate culture and stimulated with curcumin (10⁻⁵M and 10⁻⁷M) and LPS (1 µg / ml). The culture medium was collected 24 hours after the LPS stimulation. Treatment of culture with curcumin resulted in decreased accumulation of nitrite and cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin 1β (IL-1β) and interleukin 6 (IL-6) in relation to the culture treated with LPS only, however, no change in IL-10 production was observed. In the *in vivo* studies, the two doses of curcumin evaluated did not alter nitrate and lactate production in LPS-treated animals. Treatment with curcumin 20 mg / kg showed inhibitory effect on TNF-α and IL-6 production, however, resulted in an increase in IL-1β concentration. The two doses of curcumin evaluated did not alter the serum concentration of IL-10 in LPS-treated animals. Our results showed that a solid dispersion of curcumin was able to reduce the production of cytokines by peritoneal macrophages and also when administered endovenously. These results may serve as the basis for further *in vivo* studies, which are needed to understand the effect of curcumin on the inflammatory response during endotoxemia and sepsis.

Descriptors: Curcumin. Sepsis. Lipopolysaccharide.

RESUMEN

AGUIAR, G. C. S. de. **Efecto de la curcumina sobre la respuesta inflamatoria estimulada por el lipopolisacárido *in vitro* e *in vivo***. 2019, 63 f. Disertación (Maestría) – Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

La sepsis ocurre como consecuencia de la respuesta inmunológica exacerbada del huésped a la infección que puede ser causada por diversos agentes etiológicos, como bacterias, virus, protozoos y hongos. Debido a su alta incidencia, la sepsis se considera un problema de salud mundial con la ocurrencia de alrededor de 18 millones de casos cada año en todo el mundo. Los componentes de patógenos, como la endotoxina lipopolisacárido (LPS), presente en la pared celular de bacterias gramnegativas, desencadenan la liberación de mediadores inflamatorios, como citocinas pro-inflamatorias y óxido nítrico (NO), con el objetivo de eliminar el patógeno, sin embargo, la producción excesiva de estos mediadores lleva al organismo a un estado de anergia e inmunosupresión. La curcumina, sustancia presente en una planta tropical llamada *Curcuma L.*, es conocida por sus efectos antitumoral, inmunomodulador y antioxidante. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto inmunomodulador de una dispersión sólida de curcumina tras el estímulo con LPS *in vivo* e *in vitro* en cultivo de macrófagos peritoneales. Para alcanzar el objetivo, se realizaron experimentos *in vivo*, en los que las ratas recibieron una inyección endovenosa de curcumina en dos dosis (2 mg / kg y 20 mg / kg) seguida de la inyección de LPS (1,5 mg / kg). Cuatro horas después de la administración de LPS los ratones fueron decapitados para la recolección de la sangre. Para los experimentos *in vitro* se realizó lavado peritoneal de ratas para la recolección de los macrófagos residentes. Estos fueron mantenidos en cultivo en placa de 24 pocillos y estimulados con curcumina (10-5M y 10-7M) y LPS (1 µg / ml). El medio de cultivo fue recolectado 24 horas después del estímulo con LPS. El tratamiento del cultivo con curcumina resultó en una disminución de la acumulación de nitrito y de las citocinas factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucina 1 beta (IL-1β) e interleucina 6 (IL-6) en relación al cultivo tratado con LPS sólo, sin embargo, no se observó alteración en la producción de IL-10. En los estudios *in vivo*, las dos dosis de curcumina evaluadas no alteraron la producción de nitrato y lactato en los animales tratados con LPS. El tratamiento con curcumina 20 mg / kg mostró efecto inhibitorio sobre la producción de TNF-α e IL-6, sin embargo, resultó en un aumento en la concentración de IL-1β. Las dos dosis de curcumina evaluadas no alteraron la concentración sérica de IL-10 en los animales tratados con LPS. Nuestros resultados mostraron que una dispersión sólida de curcumina fue capaz de reducir la producción de citocinas por macrófagos peritoneales y también cuando se administró endovenosamente. Estos resultados pueden servir de base para la realización de más estudios *in vivo*, los cuales son necesarios para comprender el efecto de la curcumina sobre la respuesta inflamatoria durante la endotoxemia y la sepsis.

Descriptores: La curcumina. Sepsis. Lipopolisacárido.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Efeito do tratamento com curcumina (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M) e/ou LPS ($1\mu\text{g/ml}$) sobre a produção de nitrito (1A) e citotoxicidade (1B) em cultura de macrófagos peritoneais. Letras diferentes representam significância estatística..... 34
- Figura 2** - Efeito do tratamento com curcumina (10^{-5} M e 10^{-7} M) e/ou LPS ($1\mu\text{g/ml}$) sobre a produção de nitrito em cultura de macrófagos peritoneais. Letras diferentes representam significância estatística..... 36
- Figura 3** - Efeito do tratamento com curcumina (10^{-5} M e 10^{-7} M) e/ou LPS ($1\mu\text{g/ml}$) sobre a produção de TNF- α (3A), IL-1 β (3B), IL-6 (3C) e IL-10 (3D) em cultura de macrófagos peritoneais. Letras diferentes representam significância estatística..... 37
- Figura 4** - Efeito do tratamento com curcumina (2 mg/kg e 20 mg/kg) e/ou LPS (1,5 mg/kg) sobre a produção de nitrato (4A) e lactato (4B) *in vivo*. Letras diferentes representam significância estatística. Número de animais por grupo: 5-7..... 39
- Figura 5** - Efeito do tratamento com curcumina (2 mg/kg e 20 mg/kg) e/ou LPS (1,5 mg/kg) sobre a produção de TNF- α (5A), IL-1 β (5B), IL-6 (5C) e IL-10 (5D) *in vivo*. Letras diferentes representam significância estatística. Número de animais por grupo: 5-7..... 39
- Figura 6** - Efeito do tratamento com curcumina (2 mg/kg e 20 mg/kg) e/ou LPS (1,5 mg/kg) sobre a catalase (6A), capacidade antioxidante total (6B) e TBARS (6C) *in vivo*. Letras diferentes representam significância estatística. Número de animais por grupo: 5-7..... 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
AMS	Assembleia Mundial de Saúde
CARS	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i> ou ligadora e punção cecal
CO₂	Dióxido de Carbono
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Dano
DMSO	Sulfóxido de Dimetilo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ESICM	<i>European Society of Intensive Medicine</i>
EUA	Estados Unidos da América
GHS	Glutationa
GPx	Glutationa Peroxidase
H₂O₂	Peróxido de Oxigênio
ILAS	Instituto Latino Americano de Sepsis
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicóico
LOX-2	Lipoxigenase 2
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MDA	Malondialdeído
MIP-1α	Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 alfa
MPP⁺	1-metil-4-fenil-piridínio
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B

NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
O₂^{·-}	Superóxido de Oxigênio
OH[•]	Hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Proteína C Reativa
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RNA	Ácido Ribonucleico
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SOD	Superóxido Dismutase
SOFA	Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos
SCCM	<i>Society Critical Care Medicine</i>
SPREAD	<i>Sepsis Prevalence Assessment Database</i>
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TLR-4	Receptor <i>Toll-like 4</i>
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1 Definição de Sepsis	16
1.2 Epidemiologia da Sepsis	18
1.3 Fisiopatologia da Sepsis	19
1.4 Curcumina	22
2. Objetivo	25
3. Material e Método	27
3.1 Tipo de estudo e animais	28
3.2 Cultura de macrófagos peritoneais	28
3.3 Avaliação da viabilidade celular	29
3.4 Canulação da veia jugular	29
3.5 Dosagem de nitrito	30
3.6 Dosagem de nitrato	30
3.7 Dosagem de citocinas	31
3.8 Avaliação do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes	31
3.9 Protocolos experimentais.....	31
Experimentos <i>in vitro</i>	31
Experimentos <i>in vivo</i>	31
3.10 Considerações éticas	32
3.11 Análise estatística	32
4. Resultados	33
4.1 Avaliação de diferentes doses de curcumina sobre a concentração de nitrito e a toxicidade celular em cultura de macrófagos peritoneais.....	34
4.2 Avaliação do efeito da curcumina sobre a concentração de nitrito, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 em cultura de macrófagos peritoneais.....	35
4.3 Avaliação do efeito da administração de curcumina sobre a concentração sérica de nitrato, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 <i>in vivo</i>	37
4.4 Avaliação do efeito da administração de curcumina sobre o estresse oxidativo <i>in vivo</i>	40
5. Discussão	42
6. Conclusão	50
Referência	52
Anexo I	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição de Sepses

Durante certo tempo, a pluralidade de termos para caracterizar sepse gerou dificuldade para uniformizar as condutas assistenciais, sendo que em 1992 foi realizada uma Conferência de consenso durante a qual a *Society Critical Care Medicine* (SCCM) e o *American College of Chest Physicians* (ACCP) publicaram as seguintes definições: Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), Sepse, Sepse Grave, Choque Séptico que foram utilizadas até 2016 (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis, 1992) .

A presença de agentes patogênicos na corrente sanguínea em conjunto com a resposta inflamatória sistêmica inespecífica do hospedeiro a essa invasão era chamada de SIRS; a evolução deste quadro associado a uma infecção por um microrganismo suspeita ou confirmada era chamada sepse; quando a sepse evoluía com complicações e disfunção de órgãos, hipoperfusão tissular, oligúria entre outros agravos era chamada sepse grave e, ainda, quando associada à disfunção hemodinâmica (hipotensão arterial não responsiva a reposição fluidos) que pode ser precoce, quando dura menos de uma hora (em resposta à infusão de solução cristalóide) ou tardia, com duração maior que uma hora e/ou necessidade de uso de aminas vasoativas, era caracterizada como choque séptico (LEVY *et al.*, 2003). Além desses critérios para diagnóstico da sepse estabelecidos em 1991, desde 2001 eram levados em consideração os marcadores biológicos, sendo estes adicionados como novos critérios para auxiliar no diagnóstico (LEVY *et al.*, 2003; DELLINGER *et al.*, 2013)

Em 2002, durante o congresso da *European Society of Intensive Medicine* (ESICM), foi lançada uma campanha internacional ao combate à sepse, denominada *Surviving Sepsis Campaign* (Campanha Sobrevivendo à Sepse) que tinha por objetivo chamar a atenção da comunidade científica e da população em geral para a gravidade que o tema abrange, além disso, objetivada reduzir a mortalidade por sepse em 25% (DELLINGER *et al.*, 2004). Essa campanha indicava a adoção das seguintes ações: conscientizar sobre a sepse, melhorar o diagnóstico, aumentar o uso de tratamento adequado, educar profissionais de saúde, melhorar os cuidados pós internação, desenvolver diretrizes de cuidado e implementar um programa de melhoria de desempenho (DELLINGER *et al.*, 2004). Com base nessas ações, em 2004 foi publicado o primeiro estudo com diretrizes baseadas em evidências para aprimorar o manejo da sepse e do choque séptico beira-leito (DELLINGER *et al.*, 2004) .

Em 2016, aconteceu o “Terceiro Consenso Internacional de Definições de Sepse e Choque Séptico (Sepsis-3)” referente aos novos critérios diagnósticos para sepse e choque séptico, mas que ainda não foram endossadas por várias instituições. Segundo o estudo, limitações nas definições anteriores incluíam: foco excessivo sobre a inflamação; o modelo equivocado de que a sepse segue fluxo que passa pela sepse grave até atingir o choque séptico e; a especificidade inadequada dos critérios da SIRS. Além disso, várias definições e terminologias estavam em uso para sepse, choque séptico e disfunção de órgãos, levando a discrepâncias na incidência e mortalidade observada. Concluíram, também, que o termo sepse grave era redundante (SINGER *et al.*, 2016).

Para o novo consenso, conceitualmente, sepse é a disfunção de órgãos com risco de vida devido à resposta desregulada do hospedeiro à infecção. Para operacionalização clínica é a infecção associada ao aumento no escore da Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos (SOFA, *Sequential Organ Failure Assessment*) de dois pontos ou mais. O escore SOFA, muito utilizado na medicina intensiva, foi escolhido como marcador de disfunção orgânica por prever melhor a mortalidade hospitalar do que outros scores como a SIRS. Já o choque séptico é definido por aquele subgrupo de pacientes com sepse no qual há requerimento de vasopressor para manter uma pressão arterial média de 65 mmHg ou superior e, o nível de lactato no soro inferior a 2 mmol/L na ausência de hipovolemia. Houve unanimidade de que o choque séptico deve refletir uma doença mais grave, com uma probabilidade muito maior de morte do que apenas a sepse. Portanto, critérios clínicos de choque séptico foram desenvolvidos com hipotensão e hiperlactatemia em vez de cada um sozinho, porque a combinação engloba tanto a disfunção celular e comprometimento cardiovascular e está associada com uma taxa de mortalidade significativamente mais elevada ajustada ao risco (SINGER *et al.*, 2016). Embora nessa conferência tenha se adotado estes critérios clínicos para o diagnóstico da sepse e do choque séptico, o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), lançou um protocolo clínico para o atendimento de pacientes adultos com sepse e choque séptico, no qual não alterou os critérios utilizados anteriormente, isso aconteceu em decorrência a alta mortalidade em países em desenvolvimento e de os critérios anteriores serem fundamentais para a identificação precoce de sepse (ILAS, 2018).

As principais disfunções orgânicas descritas neste protocolo são a hipotensão (PAS < 90 mmHg ou PAM < 65 mmHg ou queda de PA > 40 mmHg), oligúria ($\leq 0,5\text{mL/Kg/h}$) ou elevação da creatinina (>2mg/dL); relação PaO₂/FiO₂ < 300 ou necessidade de O₂ para manter SpO₂ > 90%; contagem de plaquetas < 100.000/mm³ ou redução de 50% no número de plaquetas em

relação ao maior valor registrado nos últimos 3 dias; lactato acima do valor de referência; rebaixamento do nível de consciência, agitação, *delirium* e o aumento significativo de bilirrubinas (> 2X o valor de referência) (ILAS, 2018).

Como forma de trazer atenção ao tema, em 2017, a Assembleia Mundial de Saúde (Levy *et al.*) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) nomearam sepse como uma prioridade mundial de saúde, e adotaram uma resolução para prevenção, diagnóstico e gerenciamento da sepse (REINHART *et al.*, 2017).

Embora a sepse seja uma prioridade global, a maioria das publicações são de países desenvolvidos, causando uma escassez de evidências em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, sendo importante desenvolver e adequar tratamentos que sejam acessíveis a todos (CECCONI *et al.*, 2018).

1.2 Epidemiologia da Sepse

A sepse é vista como um problema de saúde mundial, afetando milhões de pessoas e causadora de altos índices de morbidade e mortalidade. Acredita-se que 18 milhões de casos ocorram anualmente no mundo (JAIMES, 2005) sendo que a cada quatro pessoas diagnosticadas com sepse, uma é por ela vitimada (DELLINGER *et al.*, 2008).

A sepse é considerada um problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de mortes nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). O estudo Sepse Brasil publicado em 2003, mostrou que na análise 75 UTIs, a prevalência maior é das bactérias Gram-negativas, seguidas pelas infecções de bactérias Gram-positivas. Nesse estudo, a sepse, sepse grave e choque séptico ocorreram em 19,6%, 29,6 e 50,8% dos casos, respectivamente. Quanto à mortalidade, os subgrupos sepse, sepse grave e choque séptico apresentaram 16,70%, 34,40% e 65,30% respectivamente (JÚNIOR *et al.*, 2006). Outro estudo realizado pelo ILAS demonstrou que em 230 UTIs selecionadas aleatoriamente, 30% dos pacientes internados apresentavam o diagnóstico de sepse ou choque séptico (ILAS, 2015).

Um estudo epidemiológico de coorte denominado *Sepsis Prevalence Assessment Database* (SPREAD) com amostra de representatividade nacional mostrou que a sepse ainda possui um prognóstico ruim nos pacientes que são admitidos em UTIs, com mortalidade hospitalar de 55% (MACHADO *et al.*, 2017). Outro aspecto observado pelo estudo SPREAD é que a maior prevalência de sepse pode ocorrer devido à falta de unidades de cuidado

intermediário, o que contribui para maior tempo de internação em UTIs, favorecendo o desenvolvimento da sepse (MACHADO *et al.*, 2017).

A gravidade clínica e o aumento do número de casos de sepse estão relacionados com vários fatores como, o aumento da expectativa de vida, da prevalência de idosos, do número de pacientes imunocomprometidos, do uso indiscriminado de antibióticos, da frequência de procedimentos invasivos e a prevalência elevada de doenças crônicas na população. Essas condições favorecem tanto a ocorrência da sepse quanto o seu agravamento e a ocorrência de óbito (MARTIN *et al.*, 2003; RANGEL-FRAUSTO, 2005; YANG *et al.*, 2010). Cada vez mais é frequente a admissão de pacientes com mais de 80 anos nas UTIs e é estimado que essa tendência se mantenha (KUMAR *et al.*, 2011), pois a população está envelhecendo, sendo previsto que até o ano de 2050 haja um aumento de 9% na população octogenária da Europa e América do Norte (ANGUS *et al.*, 2001). Estudos sugerem que os idosos são mais susceptíveis a desenvolver sepse do que pessoas jovens, já que são pessoas acometidas por comorbidades e imunossupressão (NASA *et al.*, 2012).

Além de apresentar uma alta mortalidade e morbidade, a sepse acarreta uma série de custos para o sistema de saúde (DANNA, 2018); sendo considerada em 2011 no *National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011: Statistical Brief#160* (TORIO; ANDREWS, 2016) como a doença mais cara para se obter um diagnóstico; esta indicação se manteve em 2013 (TORIO; MOORE, 2016) .

1.3 Fisiopatologia da Sepse

A sepse pode ser causada por bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), protozoários, fungos e vírus (ILAS, 2015), no entanto, as bactérias Gram-negativas são as mais frequentemente isoladas em pacientes com sepse e estão associadas aos altos índices de mortalidade (VINCENT *et al.*, 2009).

Experimentalmente, a sepse pode ser estudada a partir de diferentes modelos que estimulam a resposta inflamatória do organismo, como a administração de componentes da parede celular de bactérias Gram-positivas (ácido lipoteicóico e peptídeoglicano) e Gram-negativas (lipopolissacarídeo - LPS) (RUSSELL, 2006), sendo nestes casos denominada endotoxemia (REED *et al.*, 2000). Experimentalmente, a administração de LPS é o modelo mais utilizado.

Os componentes de patógenos, como o LPS das bactérias Gram-negativas, são os

desencadeadores da resposta inflamatória, levando a secreção de grandes quantidades de citocinas, quimiocinas, produtos de complemento e alarminas (COHEN, 2002).

Durante a sepse, são observados dois direcionamentos da resposta inflamatória: uma resposta pro-inflamatória inicial seguida da resposta anti-inflamatória. A resposta pro-inflamatória tem início com o reconhecimento pelos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), que são moléculas capazes de reconhecer sinais de perigo, como por exemplo, invasão de bactéria e assim, inicia a resposta imune, um exemplo de PRRs, são os receptores *Toll-like* (MOLLEN *et al.*, 2006). Esses receptores reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que estão presentes em muitos microrganismos e não nos receptores do próprio organismo, são exemplos de PAMPs: LPS, peptidoglicano, lipopeptídeo (presentes em vários patógenos), entre outros (AKIRA *et al.*, 2006). Os PRRs também reconhecem sinais endógenos de perigo, denominados alarminas ou DAMPs (padrões moleculares associados a dano), que são moléculas liberadas quando há estresse inflamatório, como queimaduras, traumas ou necrose de tecidos (CHAN *et al.*, 2012 ; CHEN; NUÑEZ, 2010).

A resposta pro-inflamatória é impulsionada pela ativação de leucócitos, complemento e o sistema de coagulação. É importante salientar que fatores como direção, extensão e duração da resposta inflamatória na sepse depende de características do organismo infectado, como genótipo, idade, comorbidades, medicações, fatores patogênicos incluindo a virulência e a carga microbiana (WIERSINGA *et al.*, 2014).

A resposta inflamatória inicia-se com o reconhecimento do LPS pelos macrófagos por meio de um complexo de receptores específicos composto pela proteína ligadora de LPS, receptor CD14, receptor “toll-like”-4 (TLR-4) e proteína MD-2 (POLTORAK *et al.*, 1998; NAGAI *et al.*, 2002) . O reconhecimento do LPS por este complexo resulta em síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) que mediarão e regularão a resposta inflamatória (ARBABI; MAIER, 2002; OBERHOLZER *et al.*, 2002; CHONG; SRISKANDAN, 2011). Essas citocinas são essenciais no curso da infecção para eliminação do patógeno, contudo, a produção excessiva desses mediadores inflamatórios leva à inflamação descontrolada, que pode resultar na subsequente liberação excessiva de citocinas anti-inflamatórias, como as interleucinas 4 (IL-4) e 10 (IL-10), provocando estado de anergia e imunossupressão, também chamada de imunoparalisia (GOGOS *et al.*, 2000).

Estudos demonstram que 24 horas após a fase pro-inflamatória, acontece um fenômeno denominado CARS – *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*, que é a resposta

anti-inflamatória compensatória, podendo levar a imunodepressão. O objetivo da CARS é manter a homeostase de um organismo em situação de sepse, porém a persistência dessa resposta anti-inflamatória torna-se nociva ao organismo, aumentando os índices de mortalidade (FRAZIER; HALL, 2008). Em 1980, estudos conduzidos em UTIs com pacientes politraumatizados demonstraram que a mortalidade tardia estava ligada a um estado de imunodepressão, sendo após denominada de imunoparalisia (POLK *et al.*, 1986).

Além de produzir citocinas, os macrófagos e neutrófilos agem contra os patógenos, liberando altas quantidades espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) que são produzidas com o intuito de auxiliar na fagocitose e eliminar o agente agressor (VASCONCELOS *et al.*, 2007), originando a explosão respiratória (*respiratory burst*) dentro dessas células, e então elas liberam óxido nítrico, um dos principais radicais de nitrogênio (EL-BENNA *et al.*, 2016). O NO endógeno é formado a partir do aminoácido L-arginina através de reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase, a qual apresenta três isoformas principais: neuronal (nNOS, NOS1), induzível (iNOS, NOS2) e endotelial (eNOS, NOS 3) (WONG *et al.*, 1996).

Tanto a síntese quanto a atividade da iNOS são estimuladas pelo LPS das bactérias Gram-negativas e por citocinas como a IL-1 β , TNF- α e IL-6 (FRITSCHÉ *et al.*, 2001). O NO possui um papel central no desenvolvimento do choque circulatório que ocorre durante a sepse. A sepse em humanos (Pereira *et al.*, 2014) e a administração de LPS em animais de experimentação (endotoxemia) (STABILE *et al.*, 2010), estão associadas com aumento da síntese de NO pela iNOS. O aumento da concentração plasmática dos metabólitos do NO, e de seus metabólitos, nitrito e nitrato, reduz a capacidade de vasoconstrição, provocando agravamento dos sintomas da sepse manifestados principalmente pela hipotensão (EVANS *et al.*, 1993).

O agravamento da resposta inflamatória na sepse é caracterizado pelo aumento na produção de ERO e ERN, os quais em excesso são capazes de danificar proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos e ácidos graxos poli-insaturados, resultando em danos ou morte celular e disfunção tecidual (BONE *et al.*, 1992; KOJIMA *et al.*, 1999). Eles também estimulam a liberação de citocinas e a expressão de moléculas de adesão, levando a infiltração de granulócitos nos tecidos, que aumentam a geração de radicais livres e amplificam a resposta inflamatória (BONE *et al.*, 1992; KOJIMA *et al.*, 1999).

A resposta inflamatória durante a sepse é essencial para a eliminação dos patógenos, no entanto, quando exacerbada, tem grande potencial para causar danos teciduais, levando à morte

do paciente. Portanto, substâncias que modulem essa resposta podem ter efeito positivo no curso e desfecho da sepse.

1.4 Curcumina

A pesquisa em fitoquímicos, os componentes ativos em plantas medicinais, tem sido uma fonte importante de terapêutica clínica, oferecendo uma grande diversidade de substâncias com atividade muitas vezes farmacológica. Desde a antiguidade, os fitoquímicos têm sido usados na medicina tradicional por suas propriedades e benefícios para a saúde (NILIUS; APPENDINO, 2013). Na literatura é possível encontrar trabalhos que investigaram o potencial para uso terapêutico de mais de 13 mil plantas medicinais, correlacionando suas propriedades botânicas com sua atividade farmacológica (DAHANUKAR *et al.*, 2000).

Muitos desses produtos naturais têm atividade farmacológica ou biológica que pode ser explorada na descoberta de drogas farmacêuticas e no planejamento de medicamentos. Como exemplo, os polifenóis produzidos pelas plantas como metabólitos secundários são os antioxidantes mais abundantes na dieta humana. Nos últimos anos, um grande número de estudos demonstrou os efeitos benéficos para a saúde de sua contribuição na dieta (Farzaei *et al.*, 2015; Estrela *et al.*, 2017). Alguns extratos de plantas demonstraram modular a resposta do sistema imunológico e numerosos fitoquímicos, incluindo não apenas polifenóis, mas também polissacarídeos, flavonóides e alcalóides, têm sido estudados por suas atividades imunomoduladoras (FARZAEI *et al.*, 2015; ANDREICUT *et al.*, 2018).

A *Curcuma longa*, popularmente conhecida como açafrão, é membro da família do gengibre (Zingiberaceae) e possui cor amarela brilhante, sendo considerada uma especiaria. A *Curcuma longa* é nativa do subcontinente indiano e sudeste da Ásia, sendo a Índia o principal produtor mundial, onde é usada como remédio ayurvédico e agente aromatizante desde os tempos antigos (mais de 4000 anos) (PRIYADARSINI, 2014).

Dependendo da origem e das condições de crescimento, o pó obtido a partir da raiz seca contém diferentes porcentagens de óleos voláteis e não voláteis, proteínas, gorduras, minerais, carboidratos, curcuminóides e umidade. Os curcuminóides comercialmente disponíveis são uma combinação de três moléculas. A curcumina é a mais presente (60% a 70%), seguida da desmetoxicurcumina (20% a 27%) e da bisemeticurcumina (10% a 15%). Os curcuminóides diferem em potência, eficácia e estabilidade, sem uma clara supremacia da curcumina em relação aos outros dois compostos ou a toda a mistura (GOEL *et al.*, 2008). Até o momento, muitas limitações foram indicadas para o uso terapêutico da curcumina: suas fracas

propriedades farmacocinéticas/farmacodinâmicas, sua instabilidade química, sua baixa eficácia em diferentes modelos de doenças *in vitro* e *in vivo*, seu perfil tóxico sob certas condições experimentais (BURGOS-MORÓN *et al.*, 2010)

Diferentes formulações, mudanças no modo de administração, o desenvolvimento de sistemas de administração baseados em nanotecnologia auxiliam a superar as questões críticas ligadas à farmacocinética da curcumina para melhorar sua eficácia terapêutica e dar novas perspectivas para uma aplicação clínica deste composto natural (SERAFINI *et al.*, 2017)

Dados pré-clínicos e clínicos mostraram a eficácia da curcumina na prevenção e tratamento de várias doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, inflamatórias, metabólicas, neurológicas e de pele (para uma revisão, consultar KUNNUMAKKARA *et al.* (2017). Dentre as diferentes propriedades relacionadas à curcumina, uma das mais estudadas é o perfil anti-inflamatório que pode ser útil tanto na inflamação aguda quanto na crônica.

A atividade da curcumina decorre de sua interação com vários imunomoduladores, incluindo não apenas componentes celulares, como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B e T, mas também componentes moleculares envolvidos nos processos inflamatórios, como citocinas e vários fatores de transcrição e suas vias de sinalização (MOMTAZI-BOROJENI *et al.*, 2018).

Constatou-se que a curcumina inibe a função imunoestimuladora das células dendríticas. Esse efeito foi relacionado à supressão da expressão de CD80 e CD86, duas proteínas de membrana co-funcionais que fornecem sinal estimulatório necessário para a ativação de células T e a inibição da produção de IL-12, uma citocina pró-inflamatória, por meio da inibição da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e da translocação fator nuclear kappa B (NF- κ B)(KIM *et al.*, 2005).

Apesar do potencial imunomodulador da curcumina, o fato de ela ser insolúvel em água prejudica sua absorção pelo organismo. Para melhorar sua solubilidade, um processo fitotecnológico denominado *spray drying* foi desenvolvido, produzindo dispersão sólida de curcumina. Essa dispersão aumenta a solubilidade da curcumina em água, facilitando o seu uso (MARTINS *et al.*, 2013). Um estudo recente, o qual avaliou o efeito da administração oral da dispersão sólida de curcumina sobre as alterações imunológicas e metabólicas em ratos submetidos à sepse por ligação e punção do ceco (CLP), demonstrou que a curcumina foi capaz de modular a produção de citocinas, além de melhorar a hipoglicemia e hipovolemia causadas pela sepse (SILVA *et al.*, 2017).

Assim, percebe-se que a análise do efeito de substâncias naturais sobre o organismo ou sobre culturas de células, modulando a resposta inflamatória, é de extrema importância no desenvolvimento de novas ações terapêuticas que possam ser aplicadas em situações clínicas graves como a sepse. Este estudo pretendeu analisar o potencial imunomodulador da curcumina durante a endotoxemia e *in vivo* e *in vitro*. No caso da endotoxemia, a administração endovenosa de curcumina simula o que se aproxima do cuidado ao paciente crítico. A cultura de macrófagos foi escolhida pela importância dessas células na orquestração da resposta inflamatória. Nossa hipótese era que **a curcumina possui ação anti-inflamatória, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e NO *in vivo* e *in vitro*.**

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito imunomodulador de uma dispersão sólida de curcumina durante a endotoxemia em ratos e em cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS.

Especificamente:

- Avaliar o efeito da curcumina sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e da citocina anti-inflamatória IL-10 *in vivo* e *in vitro*;
- Avaliar o efeito da curcumina sobre a produção NO e lactato *in vivo* e *in vitro*;
- Avaliar o efeito da curcumina sobre parâmetros de estresse oxidativo em animais submetidos à endotoxemia;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo e animais

Neste estudo foi adotado o modelo experimental laboratorial. Foram utilizados 44 ratos Wistar, da linhagem Hannover, com 45 dias de vida, provenientes do Biotério Central do Campus da USP – Ribeirão Preto. Após a chegada ao Biotério de manutenção do Laboratório de Fisiologia da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, os animais foram mantidos em caixas plásticas com tampa aramada, com dimensão de 1.360 cm², na densidade de quatro animais por caixa por pelo menos 48 horas. Cada caixa foi acondicionada em uma estante ventilada (Alesco), que permite controle de iluminação, temperatura de aproximadamente 23°C e ciclo de claro/escuro de 12 horas. Foi permitido livre acesso à água e à dieta comercial balanceada. Todos os experimentos foram iniciados entre 7:00 e 9:00h.

3.2 Cultura de macrófagos peritoneais

Três dias antes da cultura os animais receberam a injeção intraperitoneal de 10 ml de tioglicolato na concentração 3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). No dia da cultura foi realizado o lavado peritoneal com 10 ml de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) incompleto. O lavado foi centrifugado a 530g por 10 minutos à temperatura ambiente, o precipitado transferido para outro recipiente e o volume completado para 5 ml. Em seguida foi feita a contagem do número de células obtido utilizando uma câmara de Neubauer e microscópio. O volume correspondente a 1×10^6 células (teste da dose de curcumina) ou 2×10^6 células (dosagens subsequentes) foi transferido para placa plástica de cultura de tecidos de 24 poços e completado para 1 ml com RPMI-1640 acrescido de soro fetal bovino 10% e os antibióticos penicilina (10.000 unidades/ml) e estreptomicina (10 mg/ml) (RPMI completo, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

As placas permaneceram por 2 horas a 37,4°C em ar atmosférico contendo 5% de CO₂ umidificado para que ocorresse a adesão dos macrófagos. Em seguida os poços foram lavados 2 vezes com 1 ml de RPMI-1640 incompleto para remoção das células não aderidas, novamente colocado 1 ml de RPMI-1640 completo e iniciados os estímulos. Durante o período experimental a placa permaneceu na estufa. O meio de cultura foi coletado 24 horas após o estímulo com curcumina e LPS.

3.3 Avaliação da viabilidade celular

A citotoxicidade da curcumina foi avaliada pela análise da viabilidade celular, por meio do teste MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]}. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan {E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

Para este teste, o volume referente à $0,5 \times 10^6$ células foi pipetado em placa de cultura de células de 96 poços e os tratamentos aplicados. A placa foi mantida por 24 horas a 37,4°C em ar atmosférico contendo 5% de CO₂ umidificado. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e substituído meio de cultura RPMI-1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1 mg/ml de MTT. A placa foi mantida por quatro horas a 37,4°C em ar atmosférico contendo 5% de CO₂ umidificado. Após esse período, o conteúdo da placa foi descartado e foi adicionado 100 µ de sulfóxido de dimetilo (DMSO), a seguir, a placa foi agitada por 5 minutos para dissolução do MTT e a cor azul formada foi avaliada em leitor de microplacas em comprimento de onda 550nm.

3.4 Canulação da veia jugular

No dia anterior ao experimento, os animais tiveram a veia jugular externa direita canulada sob anestesia geral com uma mistura de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Foram utilizadas cânulas de tubos de silicone (Silatic®, Dow Corning Co., Midland, MI, EUA) com comprimento total de 10 cm e diâmetro interno de 0,5 mm e externo de 0,9 mm. Após tricotomia da região supraclavicular direita e cervical dorsal, o animal foi fixado em uma mesa cirúrgica, e a veia jugular externa identificada por transparência. Uma incisão longitudinal de 0,5 cm foi feita na superfície ventral do pescoço, a cerca de 1 cm à direita da traqueia. A musculatura foi retraída, a veia jugular direita exposta e o tecido conjuntivo ao seu redor removido. Uma ligadura e uma pequena incisão na parede superior da veia foram realizadas. Por essa incisão a cânula foi introduzida dentro da veia cava superior através da veia jugular permitindo que apenas 1,7 cm da cânula progredisse em direção ao átrio direito, e sua fixação no local foi feita por ligaduras com fios de algodão. A extremidade distal da cânula foi

exteriorizada na região cervical dorsal através de um trajeto subcutâneo com o auxílio de um trocater. Após este procedimento, a cânula foi lavada e preenchida com solução salina heparinizada (10 UI/mL) livre de pirógenos para evitar obstrução da mesma por sangue coagulado. A oclusão da cânula foi realizada através de laço, feito com o auxílio de pinça cirúrgica, visando impedir o refluxo de sangue para dentro da cânula. No local da incisão cirúrgica, os planos foram fechados em bloco com pontos simples, utilizando-se fio de seda 4.0. Após a cirurgia, os animais foram mantidos sem manipulação até o início da sessão experimental na manhã seguinte, com acesso livre à água e à ração. Através desta via, foram realizadas as injeções endovenosas de drogas.

3.5 Dosagem de nitrito

O procedimento utilizado para a análise de nitrito no meio de cultura fundamentou-se no método de Griess. Este método tem como fundamentação a reação colorimétrica de diatolização dos nitritos com ácido sulfanílico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em meio ácido (pH entre 2,5 e 5,0), formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-sulfônico de coloração rósea, cuja intensidade é proporcional à concentração de nitrito presente na amostra. As leituras das amostras foram realizadas por meio de espectrofotometria na região visível, fixando-se o comprimento de onda em 474nm.

3.6 Dosagem de nitrato

A concentração de nitrato no plasma foi realizada por meio da técnica de quimioluminescência NO/Ozônio (Hampl, 1996). As amostras foram desproteinizadas pela adição de 100µl de etanol gelado a 50µl de amostra. Após adição do etanol, as amostras foram agitadas e mantidas por 30 min em frízer (-20°C) e, em seguida, submetidas à centrifugação (4000 g, 25°C, 5 min). A dosagem de nitrato foi realizada usando 5µL de amostra injetada em um vaso de reação contendo o agente redutor (1% de NaI em ácido acético) para converter nitrito em óxido nítrico em quantidades equimolares. O NO foi degradado usando hélio para a câmara de quimioluminescência do Sievers NOanaliser (Sievers 280 NOA, Sievers, Boulder, CO, USA);

3.7 Dosagem de citocinas

A produção de citocinas foi avaliada por meio da técnica ELISA (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*), a qual se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Foram avaliadas as seguintes citocinas: IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10. Foram utilizados kits da R&D Systems (Minneapolis, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante.

3.8 Avaliação do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes

O estresse oxidativo foi avaliado pela análise das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), as quais são espécies derivadas da peroxidação de lipídios que acarretam alterações na estrutura e permeabilidade celular evidenciados pela quantificação de produtos da peroxidação lipídica como o malondialdeído. Para a análise pelo TBARS foi utilizado kit comercial (TBARS Assay kit, Cayman). O kit foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante. Adicionalmente, foi analisada a enzima antioxidante catalase e a capacidade antioxidante total utilizando kits comerciais (Catalase Assay Kit e Antioxidant Assay Kit, Cayman). Os kits foram utilizados seguindo as recomendações do fabricante.

3.9 Protocolos experimentais

Experimento *in vitro*

Em culturas, as unidades experimentais são os poços da placa de cultura. Para avaliar o efeito da curcumina sobre a produção de citocinas e nitrito, os poços receberam os seguintes tratamentos: salina (controle), curcumina e curcumina + LPS. Foram utilizados seis poços para cada tratamento. A dose de LPS utilizada na cultura foi 1 μ g/ml (STEENSEN *et al.*, 2018). Para definição da dose de curcumina que seria utilizada foi realizado um teste com as seguintes doses: 10⁻⁵M, 10⁻⁶M, 10⁻⁷M e 10⁻⁸M.

Experimento *in vivo*

Para avaliar o efeito da administração sistêmica de curcumina sobre a resposta inflamatória e o estresse oxidativo foram utilizados os seguintes grupos experimentais: salina + salina, curcumina + salina, salina + LPS e curcumina + LPS. As doses de curcumina (2mg/kg

e 20mg/kg) e LPS (1,5 mg/kg) se basearam em estudos anteriores (STABILE *et al.*, 2016). A curcumina e o LPS foram administrados concomitantemente. Os animais foram decapitados 4 horas após a administração de LPS, o que coincide com a fase intermediária da resposta inflamatória neste modelo experimental, sendo possível avaliar tanto citocinas pró-inflamatórias como anti-inflamatórias. O sangue foi coletado em tubo plástico gelado, centrifugado (1200 g, 4°C, 20 min) e armazenado a -20°C para dosagens posteriores.

3.10 Considerações éticas

Este estudo foi submetido à avaliação ética pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, sendo seu desenvolvimento aprovado sob o número 19.1.227.22.3

3.11 Análise estatística

Todos os valores foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) e teste post hoc Tukey. A análise estatística foi calculada pelo software Prism GraphPad 7.0. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4.RESULTADOS

4.1 Avaliação de diferentes doses de curcumina sobre a concentração de nitrito e a toxicidade celular em cultura de macrófagos peritoneais.

Na Figura 1A observa-se o efeito de diferentes doses de curcumina sobre a produção de nitrito por macrófagos peritoneais tratados com LPS. As diferentes doses de curcumina testadas (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M) mostraram efeito inibidor sobre a produção de nitrito pelos macrófagos. A concentração média de nitrito nos poços tratados com LPS foi superior a presente nos poços controle (41,89 μ M, DP = 2,68 μ M vs. 0,97 μ M, DP = 0,21 μ M, $p < 0,001$), já para os poços tratados com LPS + curcumina as concentrações médias foram: 10^{-8} M: 14,70 μ M (DP = 4,48 μ M, $p < 0,001$); 10^{-7} M: 17,69 μ M (DP = 7,80 μ M, $p < 0,001$); 10^{-6} M: 19,54 μ M (DP = 8,59 μ M, $p < 0,001$); 10^{-5} M: 7,89 μ M (DP = 3,23 μ M, $p < 0,001$), sendo todas estatisticamente diferentes quando comparadas ao grupo LPS. A curcumina isolada não apresentou efeito sobre a produção de nitrito. A Figura 1B mostra a avaliação da toxicidade da curcumina em diferentes concentrações (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M). Nota-se que nenhuma das concentrações testadas mostrou efeito citotóxico sobre os macrófagos peritoneais.

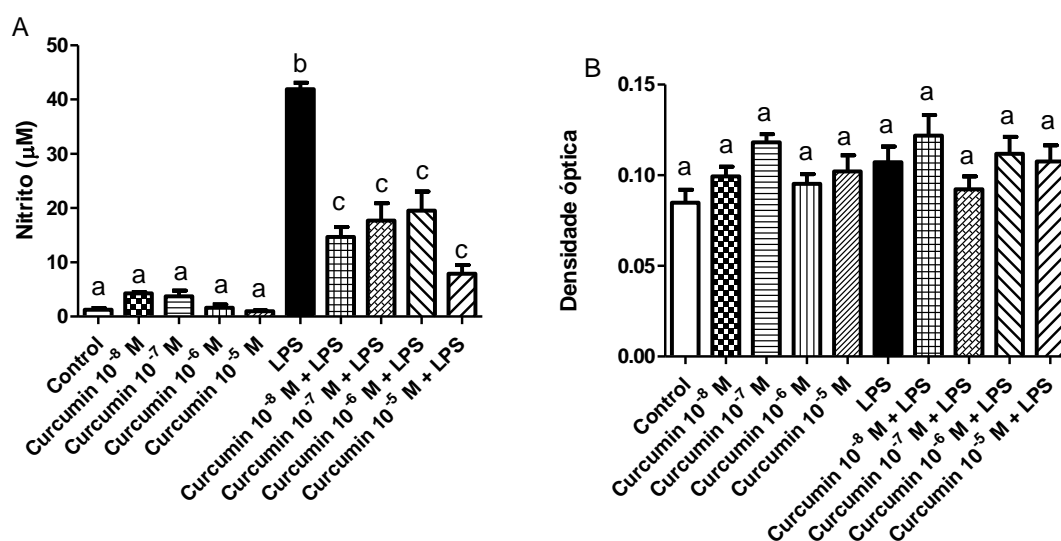


Figura 1. Efeito do tratamento com curcumina (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M) e/ou LPS (1 μ g/ml) sobre a produção de nitrito (1A) e citotoxicidade (1B) em cultura de macrófagos peritoneais. Letras diferentes representam significância estatística.

4.2 Avaliação do efeito da curcumina sobre a concentração de nitrito, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 em cultura de macrófagos peritoneais.

A fim de que todas as dosagens seguintes fossem realizadas a partir da mesma cultura, uma nova cultura de células foi preparada e a dosagem de nitrito repetida. Novamente, o tratamento com LPS resultou em aumento no acúmulo de nitrito no meio de cultura em relação ao grupo controle (90,42 μ M, DP = 9,35 μ M vs. 48,35 μ M, DP = 4,02 μ M, $p < 0,001$), além disso, o tratamento da cultura com curcumina 10^{-5} M + LPS (19,00 μ M, DP = 4,12 μ M, $p < 0,001$) e curcumina 10^{-7} M + LPS (45,53 μ M, DP = 4,12 μ M, $p < 0,001$) também resultaram em diminuição significativa do acúmulo de nitrito em relação à cultura tratada com LPS apenas (Figura 2).

Em relação ao TNF- α , o tratamento da cultura com LPS resultou em aumento no acúmulo dessa citocina no meio de cultura em relação ao grupo controle (3.776 pg/ml, DP = 1.646 pg/ml vs. 106,04 pg/ml, DP = 237,06 pg/ml, $p < 0,001$), além disso, o tratamento da cultura com curcumina 10^{-5} M + LPS (2.136 pg/ml, DP = 914,8 pg/ml, $p < 0,05$) e curcumina 10^{-7} M + LPS (2.051 pg/ml, DP = 417,2 pg/ml, $p < 0,05$) também resultaram em diminuição significativa do acúmulo de nitrito em relação à cultura tratada com LPS apenas (Figura 3A).

Em relação a IL-1 β , o tratamento da cultura com LPS resultou em aumento no acúmulo dessa citocina no meio de cultura em relação ao grupo controle (2.523 pg/ml, DP = 308,8 pg/ml vs. 1.015 pg/ml, DP = 250,2 pg/ml, $p < 0,001$), além disso, o tratamento da cultura com curcumina 10^{-5} M + LPS (1.194 pg/ml, DP = 395,9 pg/ml, $p < 0,001$) e curcumina 10^{-7} M + LPS (802,9 pg/ml, DP = 647,6 pg/ml, $p < 0,001$) também resultaram em diminuição significativa do acúmulo de nitrito em relação à cultura tratada com LPS apenas (Figura 3B).

Resultado semelhante foi observado em relação à IL-6. O tratamento da cultura com LPS resultou em aumento no acúmulo dessa citocina no meio de cultura em relação ao grupo controle (13.391 pg/ml, DP = 1.004 pg/ml vs. 1.646 pg/ml, DP = 413,1 pg/ml, $p < 0,001$), além disso, o tratamento da cultura com curcumina 10^{-5} M + LPS (10.073,1 pg/ml, DP = 306,3 pg/ml, $p < 0,001$) e curcumina 10^{-7} M + LPS (10.879 pg/ml, DP = 728,8 pg/ml, $p < 0,001$) também resultaram em diminuição significativa do acúmulo de nitrito em relação à cultura tratada com LPS apenas. No entanto, nota-se que os poços que foram tratados apenas com curcumina 10^{-5} M apresentaram concentração de IL-6 maior quando comparados aos poços controle (4.182 pg/ml, DP = 80,6 pg/ml vs. 1.646 pg/ml, DP = 413,1 pg/ml, $p < 0,001$) (Figura 3C).

O tratamento da cultura com LPS resultou ainda em aumento do acúmulo de IL-10 no meio de cultura em comparação aos poços controle (610,5 pg/ml, DP = 242,4 pg/ml vs. 86,42 pg/ml, DP = 37,27 pg/ml, $p < 0,001$). No entanto, não foi observada alteração no acúmulo de nitrito nos poços tratados com curcumina 10^{-5} M + LPS (336,8 pg/ml, DP = 192,0 pg/ml) e curcumina 10^{-7} M + LPS (411,5 pg/ml, DP = 162,1 pg/ml) (Figura 3D).

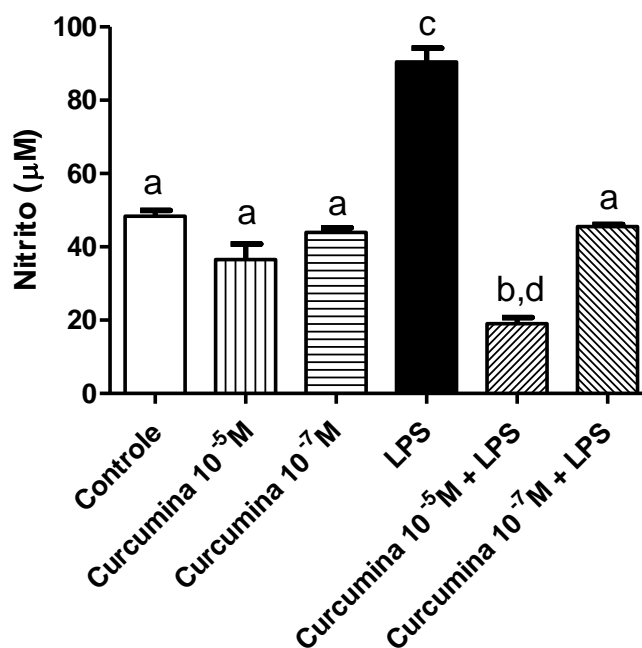


Figura 2. Efeito do tratamento com curcumina (10^{-5} M e 10^{-7} M) e/ou LPS (1µg/ml) sobre a produção de nitrito em cultura de macrófagos peritoneais. Letras diferentes representam significância estatística.

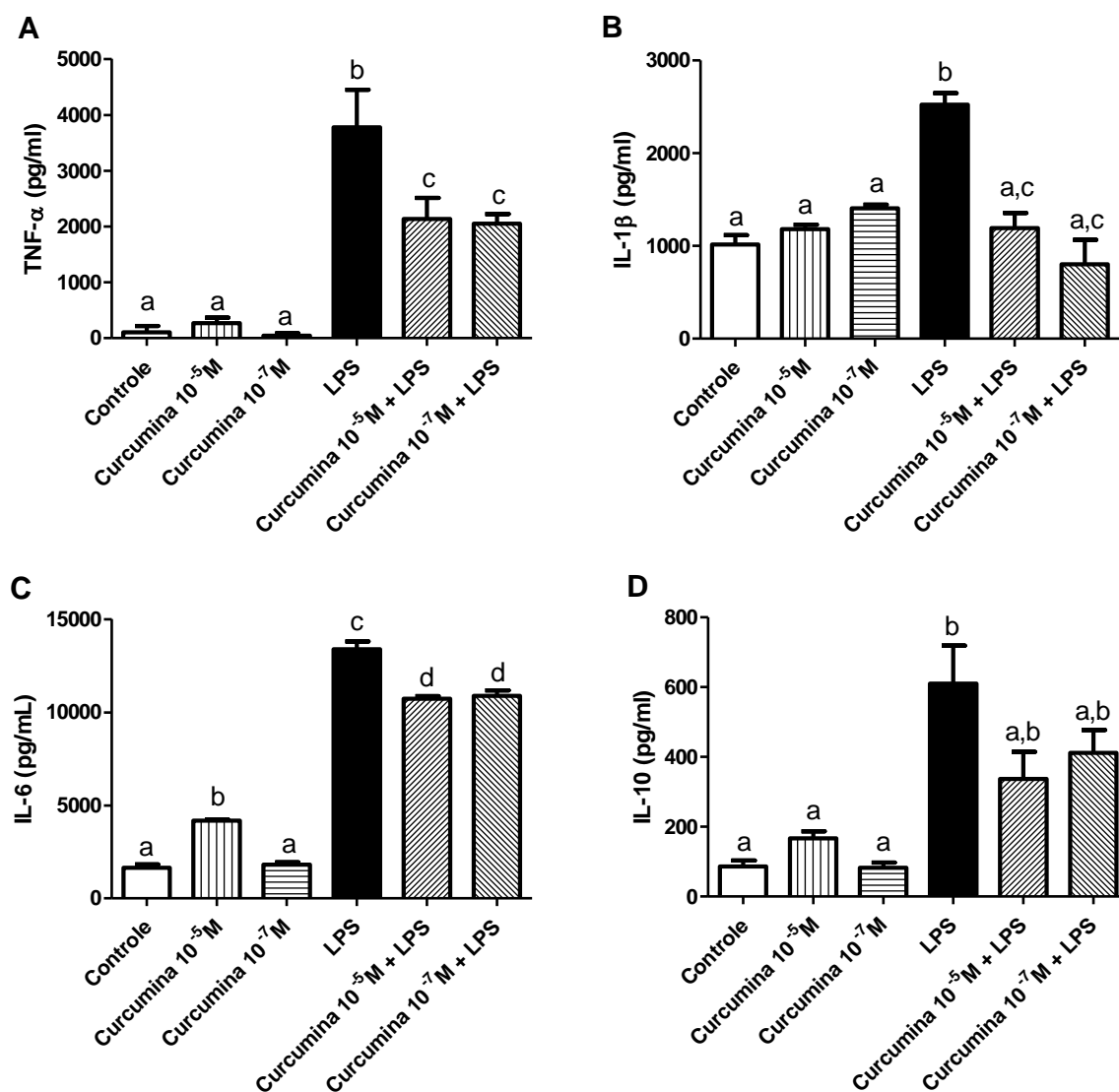


Figura 3. Efeito do tratamento com curcumina (10^{-5} M e 10^{-7} M) e/ou LPS ($1\mu\text{g/ml}$) sobre a produção de TNF- α (3A), IL-1 β (3B), IL-6 (3C) e IL-10 (3D) em cultura de macrófagos peritoneais. Letras diferentes representam significância estatística.

4.3 Avaliação do efeito da administração de curcumina sobre a concentração sérica de lactato, nitrato, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 *in vivo*.

Na Figura 4A observa-se que a administração de LPS resultou em aumento na concentração plasmática de nitrato em relação aos animais tratados com salina ($173,90\ \mu\text{M}$, DP = $37,15\ \mu\text{M}$ vs. $38,65\ \mu\text{M}$, DP $24,93\ \mu\text{M}$, $p < 0,01$). As duas doses de curcumina avaliadas não alteraram a produção de nitrato em relação aos animais tratados apenas com salina, assim como

não demonstraram efeito sobre a produção de nitrato nos animais tratados com LPS. Em relação à concentração de lactato, o tratamento dos animais com LPS resultou em aumento significativo deste composto no soro em relação aos animais controle (40,20 mg/dl, DP = 10,98 mg/dl vs. 15,52 mg/dl, DP = 3,27 mg/dl, $p < 0,05$). No entanto, não foi observado efeito da curcumina sobre o lactato sanguíneo em animais tratados com LPS (Figura 4B).

Na Figura 5 observa-se que a administração de curcumina isoladamente não alterou a produção de TNF- α (5A), IL-1 β (5B), IL-6 (5C) e IL-10 (5D) em relação aos animais tratados apenas com salina (controle).

A administração de LPS aos animais resultou em aumento significativo na concentração sérica de TNF- α em relação aos animais controle (632,40 pg/ml, DP = 238,90 pg/ml vs. 18,28 pg/ml, DP = 7,68 pg/ml, $p < 0,001$). Nos animais tratados com LPS, a curcumina 2 mg/kg não alterou a produção de TNF- α , no entanto, o tratamento com curcumina 20 mg/kg mostrou efeito inibidor sobre a produção de TNF- α (155,50 pg/ml, DP = 117,30 pg/ml vs. 632,40 pg/ml, DP = 238,90 pg/ml $p < 0,01$) (Figura 5A).

Em relação à IL-1 β , o tratamento com LPS resultou em aumento significativo na concentração sérica desta citocina em comparação aos animais controle (774,30 pg/ml, DP = 515,10 pg/ml vs. 49,02 pg/ml, $p < 0,001$). Nos animais tratados com LPS, a curcumina 2 mg/kg não alterou a produção de IL-1 β , no entanto, o tratamento com curcumina 20 mg/kg resultou em aumento na concentração de IL-1 β (3.928 pg/ml, DP = 2.128 pg/ml vs. 774,30 pg/ml, DP = 515,10 pg/ml, $p < 0,001$) (Figura 5B).

A administração de LPS aumentou a concentração sérica de IL-6 em comparação com os animais controle (13.292 pg/ml, DP = 2.447 pg/ml vs. 108,20 pg/ml, DP = 77,16 pg/ml, $p < 0,001$). Nos animais tratados com LPS, a curcumina 2 mg/kg não alterou a produção de IL-6, no entanto, o tratamento com curcumina 20 mg/kg resultou em diminuição na concentração dessa citocina (6.325 pg/ml, DP = 724,70 pg/ml vs. 13.292 pg/ml, DP = 2.447 pg/ml, $p < 0,001$) (Figura 5C).

A administração de LPS aumentou a concentração sérica de IL-10 em comparação com os animais controle (464,60 pg/ml, DP = 239,20 pg/ml vs. 0,50 pg/ml, DP = 0,57 pg/ml, $p < 0,001$). As duas doses de curcumina avaliadas não alteraram a concentração sérica de IL-10 nos animais tratados com LPS (Figura 5D).

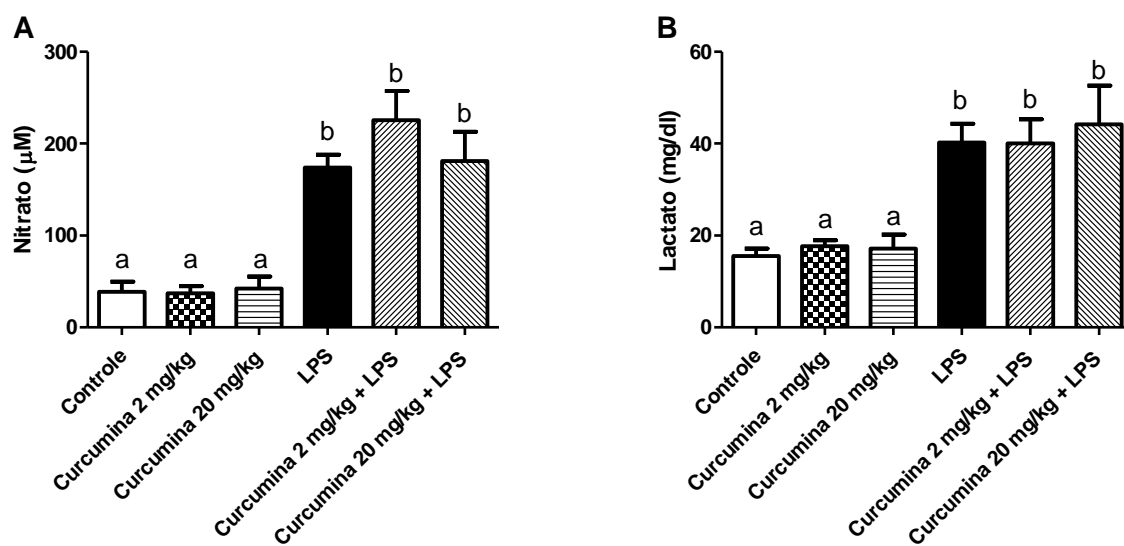


Figura 4. Efeito do tratamento com curcumina (2 mg/kg e 20 mg/kg) e/ou LPS (1,5 mg/kg) sobre a produção de nitrato (4A) e lactato (4B) *in vivo*. Letras diferentes representam significância estatística. Número de animais por grupo: 5-7.

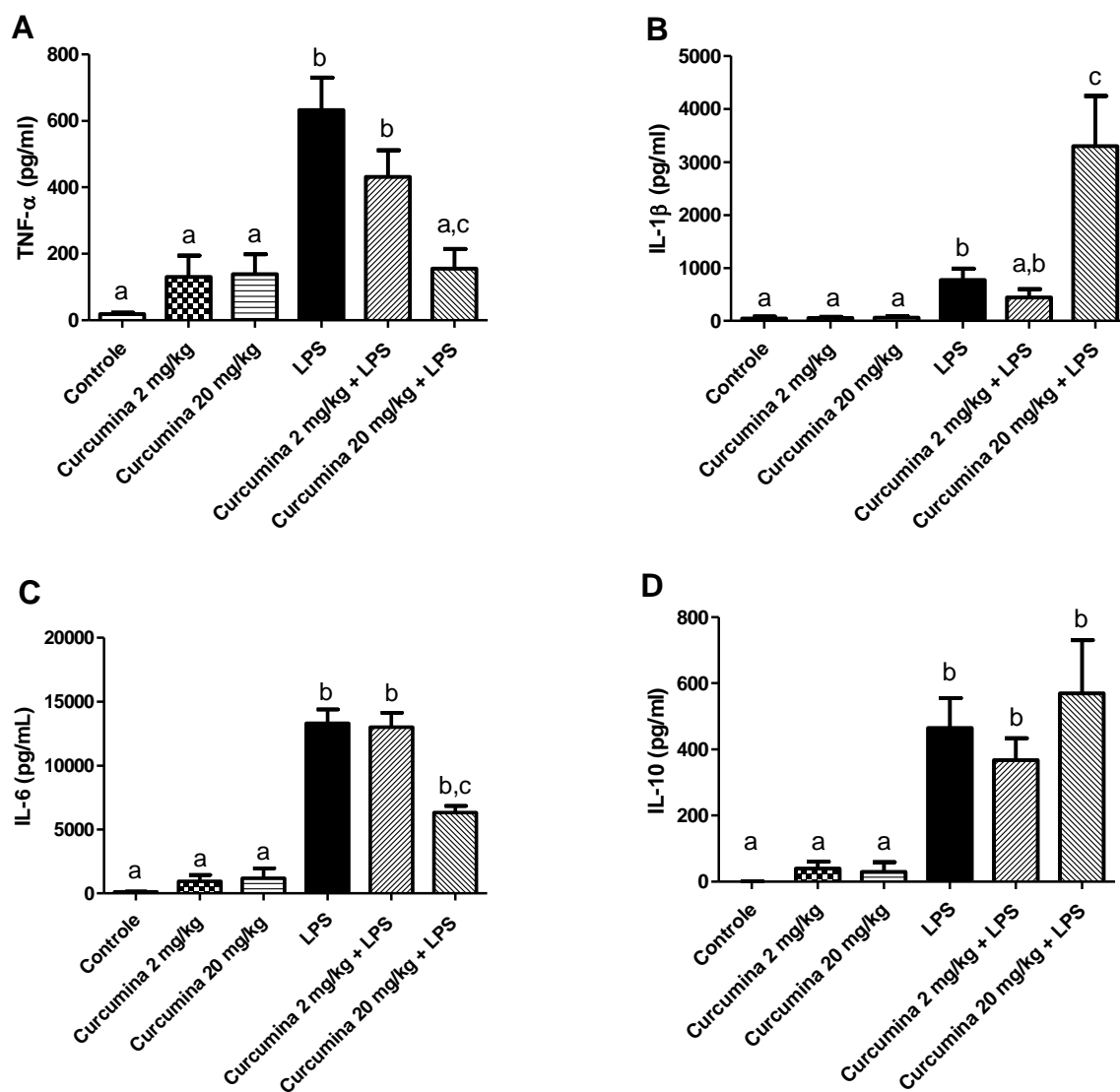


Figura 5. Efeito do tratamento com curcumina (2 mg/kg e 20 mg/kg) e/ou LPS (1,5 mg/kg) sobre a produção de TNF- α (5A), IL-1 β (5B), IL-6 (5C) e IL-10 (5D) *in vivo*. Letras diferentes representam significância estatística. Número de animais por grupo: 5-7.

4.4 Avaliação do efeito da administração de curcumina sobre o estresse oxidativo *in vivo*.

Para avaliação do estresse oxidativo foram analisadas a enzima catalase, a capacidade antioxidante total e o TBARS. Na Figura 6 observa-se que o tratamento com LPS ou a administração de curcumina não alteraram os parâmetros analisados.

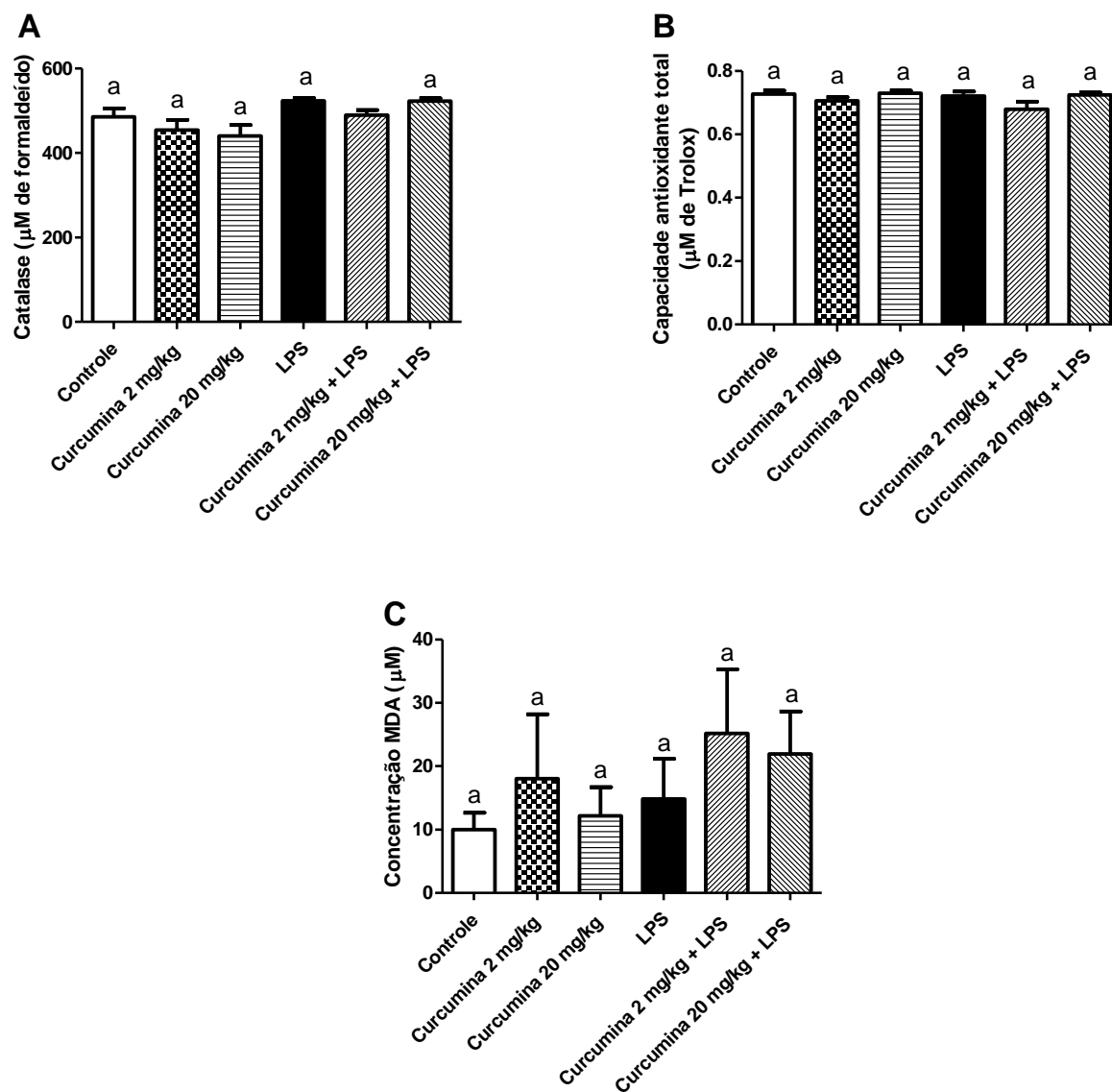


Figura 6. Efeito do tratamento com curcumina (2 mg/kg e 20 mg/kg) e/ou LPS (1,5 mg/kg) sobre a catalase (6A), capacidade antioxidante total (6B) e TBARS (6C) *in vivo*. Letras diferentes representam significância estatística. Número de animais por grupo: 5-7.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas as propriedades anti-inflamatórias de uma dispersão sólida de curcumina em relação à produção de nitrito, nitrato, lactato, citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e anti-inflamatória IL-10, em cultura de macrófagos peritoneais e em ratos durante a endotoxemia. Adicionalmente, foi avaliado o efeito da curcumina no estresse oxidativo em ratos.

Nossos resultados mostram que o tratamento da cultura com LPS elevou a concentração de nitrito no meio de cultura, em contrapartida, o co-tratamento com curcumina em duas doses diferentes (10^{-5} M e 10^{-7} M) resultou em diminuição no acúmulo de nitrito. Resultado semelhante foi observado em outro estudo que avaliou a resposta inflamatória induzida pelo ácido lipoteicóico (LTA) em células microgliais. Os autores concluíram que o mecanismo responsável por este efeito foi a inibição da fosforilação das MAPKs, incluindo ERK, p38 AKT e translocação do NF- κ B (YU *et al.*, 2018).

O tratamento da cultura de macrófagos peritoneais com LPS e curcumina resultou em diminuição do acúmulo das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6. Alguns estudos demonstraram a capacidade da curcumina de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias. KIM *et al.*, 2005 observaram que a curcumina inibiu a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α por células dendríticas derivadas da medula óssea estimuladas e com LPS, além disso, os autores mostraram que esse efeito foi decorrente da inibição da MAPK e consequente translocação do fator de transcrição NF- κ B.

Em um estudo realizado com monócitos advindos de sangue periférico humano e macrófagos alveolares estimulados com LPS, ABE *et al.* (1999) demonstrou que a curcumina inibiu de forma acentuada a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-8 e da Proteína Inflamatória de Macrófagos- 1 alfa (MIP-1 α).

A produção exacerbada de TNF- α , tem sido associada a várias doenças. Essa citocina tem a habilidade de ativar o fator de transcrição NF- κ B, ativando assim genes inflamatórios, que incluem a ciclooxigenase 2 (COX-2), lipoxigenase 2 (LOX-2), moléculas de adesão celular, citocinas inflamatórias, quimiocinas e iNOS (SUGARMAN *et al.*, 1985). Estudos mostram que a curcumina possui um efeito inibidor do TNF- α (SHISHODIA *et al.*, 2005).

Em um estudo conduzido por GUIMARÃES *et al.* (2013), foi avaliado o efeito da curcumina na modulação da resposta inflamatória de macrófagos RAW 264.7 induzida por LPS. O autor utilizou duas concentrações (5 μ M e 10 μ M) e observou que a curcumina inibiu de forma dose-dependente a expressão do RNA mensageiro (RNAm) para IL-6, enquanto que a inibição de RNAm para o TNF- α foi observada apenas na concentração de 10 μ M de

curcumina em células estimuladas com LPS. Nesse mesmo estudo, o pré-tratamento das células com curcumina 10 μ M inibiu significativamente a produção de IL-6 e TNF- α induzida por LPS. No entanto, a curcumina utilizada pelos autores não era hidrossolúvel, sendo necessária sua diluição em DMSO. Em nossos experimentos foi utilizada uma dispersão sólida de curcumina produzida pelo processo *spray drying*, o que a torna solúvel em água. Apesar da diferença no tipo de curcumina utilizada e na dose, neste estudo também foi notado o seu potente efeito anti-inflamatório.

Apesar de termos observado o efeito inibitório da curcumina sobre a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6, a produção de IL-10 não foi afetada. A IL-10 é conhecida por possuir propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, e pode ser produzida tanto de células da imunidade inata, quando da imunidade adaptativa, incluindo células dendríticas, macrófagos, mastócitos e células T, especialmente os subtipos Th2 e células T reguladoras (MOORE *et al.*, 2001). Alguns estudos trazem que a curcumina pode aumentar a expressão de IL-10. Em um modelo de dor neuropática em ratos, a curcumina aliviou a alodinia mecânica (dor provocada por leve toque) e a hiperalgesia térmica induzida pelo tetracloreto de carbono (ZHU *et al.*, 2014). Nesse estudo houve o aumento da expressão de IL-10 e a diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias pela curcumina por meio da via de receptores *toll-like 4*, o que contribuiu para o efeito antinociceptivo na medula espinhal (ZHU *et al.*, 2014).

Estudos também demonstram que o uso da curcumina aumenta os níveis de IL-10 no soro de diabéticos após tratamento com curcumina e captopril e diminuem efeitos adversos (ABD ALLAH; GOMAA, 2015). É conhecido que as concentrações de IL-10 no plasma de diabéticos são menores quando comparado a grupos controles saudáveis, também há um aumento de citocinas pró-inflamatórias especialmente o TNF- α em pacientes diabéticos (LAMPROPOULOU *et al.*, 2014; PAVKOV *et al.*, 2015). Em contrapartida, em nossos experimentos a curcumina não alterou os níveis de IL-10. Este resultado pode ser consequência do tipo de curcumina utilizada, ou mesmo do tipo celular, uma vez que foram utilizados macrófagos peritoneais.

Em nossos experimentos observamos ainda que houve um aumento da concentração de IL-6 nos poços tratados apenas com curcumina 10⁻⁵M, porém a literatura traz diversos estudos demonstrando a capacidade da curcumina de inibir a produção de IL-6, por meio da supressão da ativação do fator de transcrição NF- κ B e desregulação dos genes alvo para a produção de IL-6 (BORDOLOI *et al.*, 2016). O efeito inibidor da curcumina sobre a produção de IL-6 foi observado em modelo de periodontite em camundongos (ZHOU *et al.*, 2013), aterosclerose

(HASAN *et al.*, 2014), síndrome do desconforto respiratório agudo (AVASARALA *et al.*, 2015), artrite induzida por colágeno (HUANG *et al.*, 2013) e em hepatite induzida por concanavalina A (TU *et al.*, 2011). É importante observar que o efeito estimulatório da curcumina sobre a produção de IL-6 ocorreu apenas nos macrófagos não estimulados com LPS, naqueles que foram tratados concomitantemente com curcumina e LPS, observou-se efeito inibitório sobre a produção dessa citocina.

Como esperado, a administração sistêmica de LPS resultou em aumento na concentração sérica de nitrato, lactato e das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 (ROSSOL *et al.*, 2011). A administração concomitante de LPS e curcumina na dose 20 mg/kg reduziu a concentração sérica de TNF- α e IL-6, elevou a de IL-1 β e não afetou a concentração de nitrato, lactato e IL-10.

O lactato é um intermediário do metabolismo dos carboidratos e sua concentração sanguínea é dependente da taxa de produção e da taxa de metabolismo do fígado e rim (JON *et al.*, 1996). Na sepse, a elevação do lactato sanguíneo em pacientes críticos normalmente é interpretada como um sinal de perfusão tecidual inadequada. Na clínica, a acidose láctica não é incomum e pode levar a uma taxa de mortalidade superior a 60%, que pode chegar a 100% quando combinada com a hipovolemia (BURTIS; ASHWOOD, 1994). Um estudo que realizou infusão endovenosa contínua de curcumina por três dias antes da indução da sepse por CLP, observou redução nos níveis plasmáticos de lactato em relação aos animais não tratados com curcumina (SIDDIQUI *et al.*, 2006). Em nossos experimentos observamos aumento significativo na concentração sérica de lactato de animais submetidos à endotoxemia, porém, a curcumina não mostrou efeito supressor sobre o aumento do lactato. Essa diferença de resultados pode ser devido ao fato de nos nossos experimentos a administração ter sido realizada em bolus, juntamente com a administração de LPS.

Vários processos fisiopatológicos envolvem o NO (THIEMERMANN, 1997). Um aumento progressivo do nitrato plasmático, um metabólito estável usado como indicador de produção de NO, é observado na sepse experimental induzida pela administração de LPS (STABILE *et al.*, 2016). Embora bem conhecido por sua capacidade microbicida, uma superprodução desse gás contribui para uma diminuição da pressão arterial e para a hiporesponsividade a agentes vasoconstritores na sepse (THIEMERMANN, 1997). Dado o efeito inibitório da curcumina sobre a produção de nitrito, na cultura de macrófagos peritoneais, esperávamos ver uma diminuição nos níveis de nitrato após o tratamento endovenoso com dispersão de curcumina. Surpreendentemente, este não foi o caso, já que não vimos modificação

na concentração de nitrato no plasma dos animais tratados com LPS e curcumina em relação aos animais tratados apenas com LPS.

O efeito antioxidante da curcumina e seus efeitos benéficos já foram questionados (MANCUSO; BARONE, 2009). Sob situações específicas, altas concentrações de curcumina tem efeito oxidante em vez de antioxidante (SANDUR *et al.*, 2007). Isso estaria de acordo com as sugestões de que a produção ERO e espécies ERN, incluindo NO, pela curcumina, poderia ser responsável por seus efeitos apoptóticos que podem estar relacionados coma supressão do desenvolvimento de tumores. No entanto, a maioria destes estudos baseia-se em experiências *in vitro* e, por conseguinte, é necessário realizar estudos *in vivo* para testar quais os níveis de dosagem de curcumina que são oxidantes ou antioxidantes.

Em um estudo que utilizou um modelo de síndrome dos ovários policísticos, condição conhecida por uma inflamação crônica de baixo grau, com níveis sanguíneos de IL-6 e TNF- α elevados, o tratamento das ratas por 14 dias com curcumina em concentrações que variaram de 100 a 400 mg/kg, administrada pela via intraperitoneal, resultou em inibição da expressão do gene do para o TNF- α e reduziu os níveis circulantes de IL-6 (MOHAMMADI *et al.*, 2017).

No entanto, a maioria dos estudos que avaliou o efeito sistêmico da curcumina, a administração foi realizada por via oral e por períodos que variavam de dias a semanas. A administração de duas cápsulas contendo curcumina 150 mg duas vezes ao dia a pacientes com diabetes Mellitus tipo 2 durante 8 semanas diminuiu significativamente os níveis de proteína C reativa (PCR), IL-6 e TNF- α (USHARANI *et al.*, 2008). Além disso, após ingestão de curcuminóides na dose de 1.500 mg por seis semanas, RAHIMNIA *et al.* (2015) demonstraram redução significativa nos níveis circulantes de IL-6 e PCR.

Um estudo brasileiro utilizou a mesma dispersão de curcumina que a usada neste estudo. Nele, ratos foram tratados oralmente com curcumina na dose de 100mg/kg dia, por sete dias e submetidos à sepse por CLP. Os autores observaram um aumento temporário na sobrevida e diminuição dos níveis séricos de IL-1 β e IL-6 no plasma e no líquido peritoneal (SILVA *et al.*, 2017).

Diferente do estudo de SILVA *et al.* (2017), em nosso estudo a administração endovenosa de curcumina inibiu o aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6. As citocinas desempenham papéis importantes no processo inflamatório. Elas aumentam a atividade microbida das células fagocítica, contribuem para o recrutamento de leucócitos para o local da infecção e também são pirogênicos endógenos, mostrando correlação com o aumento da temperatura corporal (CAVAILLON, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2012). A liberação de

TNF- α a partir de macrófagos começa dentro de 30 minutos após o evento incitante, indicando que esta citocina é um importante regulador precoce da resposta imune. A administração de TNF- α a animais de experimentação causa uma síndrome que é indistinguível da sepse estimulada pela administração de LPS (BHATIA; MOOCHHALA, 2004). O TNF- α leva ao aumento na produção de macrófagos a partir de células progenitoras (FAHLMAN *et al.*, 1994), promove a ativação e diferenciação de macrófagos (WITSELL; SCHOOK, 1992) e prolonga a sobrevivência dessas células (CONTE *et al.*, 2006). Todos esses efeitos amplificam a resposta pró-inflamatória na sepse.

A IL-6 tem uma variedade de efeitos biológicos, incluindo a ativação de linfócitos B e T e a modulação da hematopoiese (BORDEN; CHIN, 1994). Em contraste com o TNF- α , a injeção de IL-6 por si só não produz um estado semelhante à sepse (PREISER *et al.*, 1991). Uma das principais funções da IL-6 é a indução da febre (CHAI *et al.*, 1996) e a mediação da resposta de fase aguda, uma reação sistêmica a um estímulo inflamatório que se caracteriza por febre, leucocitose e liberação hepática de proteínas de fase aguda tais como proteína C reativa, componentes do complemento, fibrinogênio e ferritina (KUSHNER; RZEWNICKI, 1994). Estudos *in vivo* em camundongos *knockout* para IL-6 demonstraram diminuição da inflamação pulmonar em um modelo de lesão pulmonar aguda (CUZZOCREA; SAUTEBIN, *et al.*, 1999) e diminuição da mortalidade e do desenvolvimento de falência de órgãos em um modelo de inflamação peritoneal induzida por zimosan (CUZZOCREA; DE SARRO, *et al.*, 1999). PATHAN *et al.* (2004) mostrou que a IL-6 causa depressão miocárdica na doença meningocócica. A disfunção miocárdica no choque séptico leva à diminuição da perfusão tecidual, falência de múltiplos órgãos e morte.

As citocinas TNF- α e a IL-6 são consideradas biomarcadores para a mortalidade da sepse, uma vez que são elevadas em pacientes não sobreviventes em comparação aos pacientes sobreviventes (BOZZA *et al.*, 2007). A observação de que a dispersão de curcumina diminuiu as concentrações de citocinas no soro poderia indicar um efeito anti-inflamatório que seria benéfico para o organismo.

Uma possível via para o efeito anti-inflamatório *in vivo* da curcumina seria por meio da inibição do NF- κ B. Foi anteriormente demonstrado que a atividade de NF- κ B é reduzida em aproximadamente 30% no músculo de ratos tratados com curcumina 1 hora antes e 8 e 15 horas após o estímulo séptico por CLP (POYLIN *et al.*, 2008). Além disso, uma redução sistêmica e miocárdica nessas citocinas e, finalmente, NF- κ B, também foi observada após a administração de curcumina em camundongos infectados por Coxsackievirus (SONG *et al.*, 2013). Embora

não tenhamos analisado a via NF- κ B neste estudo, supomos que os efeitos biológicos da curcumina poderiam ser devido à inibição desse fator de transcrição durante o processo inflamatório. Esta inibição pode ocorrer através do bloqueio da fosforilação do seu inibidor I κ B, que impede a translocação nuclear do NF- κ B (JURENKA, 2009; BUHRMANN *et al.*, 2011).

Além da grande produção de citocinas, a sepse também é caracterizada pela produção excessiva de oxidantes, os quais podem estar diretamente relacionados com fisiopatologia da sepse e o alto número de óbitos.

Os agentes oxidantes estão envolvidos em um grande número de reações que são essenciais para o funcionamento normal das células. Radicais livres também participam da defesa do organismo contra infecções bacterianas, regulação do tônus vascular e adesão celular. Importantes ERO na patogênese da sepse incluem os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila OH^\bullet . O_2^- e HO são radicais livres, pois possuem elétrons desemparelhados em sua molécula. As espécies reativas de nitrogênio ERN incluem o NO e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (DI MEO *et al.*, 2016).

Diante do estresse oxidativo causado pelo patógeno, o organismo possui algumas defesas antioxidantes para reduzir os danos causados. Exemplos desses antioxidantes são, a superóxido dismutase (SOD), que catalisa superóxido de oxigênio (O_2^-) em peróxido de oxigênio (H_2O_2) e a glutathione peroxidase (GPx) que converte H_2O_2 em água; os antioxidantes hidrofílicos como ascorbato, urato e glutathione (ZHU *et al.*); os radicais lipofílicos como tocoferóis, flavonóides, cartonóides e ubiquinol; e também há as enzimas que reduzem a forma oxidada de pequenas moléculas de antioxidantes (GSH redutase e ascorbato redutase) ou são responsável pela manutenção de tióis proteicos (tioredoxina redutase) (MENON; SUDHEER, 2007).

O ingrediente ativo do turmérico, a curcumina, é um antioxidante natural exógeno (EPSTEIN *et al.*, 2010). Curcumina inibe a peroxidação lipídica pela eliminação de radicais livres reativos, o dano oxidativo ao DNA, reduz a liberação de ácido araquidônico através da inibição da lipoxigenase e ciclooxigenase (WRIGHT, 2002). Além disso, essa substância também facilita a excreção de radicais de oxigênio, particularmente o ânion superóxido, dióxido de nitrogênio e radicais de hidrogênio (SAVCUN *et al.*, 2013).

YU *et al.* (2016) demonstrou que a curcumina reduziu níveis de proteínas ligadas ao estresse oxidativo, TNF- α e IL-6 enquanto os níveis de GSH eram restaurados e assim inibindo o estresse oxidativo, nesse estudo foi utilizado o tratamento de MPP⁺ (1-metil-4-fenil-piridínio) como modelo celular da Doença de Parkinson. Nesse experimento, os astrócitos dos ratos foram

previamente tratados com curcumina e depois expostos a toxina. Em nosso estudo as diferentes concentrações de curcumina testadas, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M, mostraram um efeito inibidor sobre a produção de nitrito pelos macrófagos peritoneais. Isso pode ser explicado pela capacidade da curcumina de diminuir o estresse nitrosativo. Em modelos animais utilizando o LPS, a curcumina reduziu os níveis de malondialdeído, um produto da oxidação lipídica e marcador de estresse oxidativo, e nitrato aumentando os níveis de GSH (JANGRA *et al.*, 2016). Em nossos experimentos *in vivo*, nem o tratamento com LPS nem a curcumina alteraram o estresse oxidativo (TBARS) ou as defesas antioxidantes (catalase e capacidade antioxidante total)

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que uma dispersão sólida de curcumina foi capaz de reduzir a produção de citocinas por macrófagos peritoneais e também quando administrada endovenosamente. Esses resultados podem servir como base para a realização de mais estudos *in vivo*, os quais são necessários para compreender o efeito da curcumina sobre a resposta inflamatória durante a endotoxemia e sepse.

REFERÊNCIAS

ABD ALLAH, E. S. H.; GOMAA, A. M. S. Effects of curcumin and captopril on the functions of kidney and nerve in streptozotocin-induced diabetic rats: role of angiotensin converting enzyme 1. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 40, n. 10, p. 1061-1067, 2015. ISSN 1715-5312.

ABE, Y.; HASHIMOTO, S. H. U.; HORIE, T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. **Pharmacological research**, v. 39, n. 1, p. 41-47, 1999. ISSN 1043-6618.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. J. C. Pathogen recognition and innate immunity. v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006. ISSN 0092-8674.

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med**, v. 20, n. 6, p. 864-74, Jun 1992. ISSN 0090-3493 (Print) 0090-3493.

ANDREICUT, A.-D. et al. Phytochemical analysis of anti-inflammatory and antioxidant effects of Mahonia aquifolium flower and fruit extracts. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018. ISSN 1942-0900.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical care medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303-1310, 2001. ISSN 0090-3493.

ARBABI, S.; MAIER, R. V. Mitogen-activated protein kinases. **Critical care medicine**, v. 30, n. 1, p. S74-S79, 2002. ISSN 0090-3493.

AVASARALA, S. et al. Correction: Curcumin Modulates the Inflammatory Response and Inhibits Subsequent Fibrosis in a Mouse Model of Viral-induced Acute Respiratory Distress Syndrome. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0134982, 2015. ISSN 1932-6203.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 202, n. 2, p. 145-156, 2004. ISSN 0022-3417.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-1655, 1992. ISSN 0012-3692.

BORDEN, E. C.; CHIN, P. Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 123, n. 6, p. 824-829, 1994. ISSN 0022-2143.

BORDOLOI, D. et al. Multi-targeted agents in cancer cell chemosensitization: What we learnt from curcumin thus far. **Recent patents on anti-cancer drug discovery**, v. 11, n. 1, p. 67-97, 2016. ISSN 1574-8928.

- BOZZA, F. A. et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Critical care**, v. 11, n. 2, p. R49, 2007. ISSN 1364-8535.
- BUHRMANN, C. et al. Curcumin modulates nuclear factor κ B (NF- κ B)-mediated inflammation in human tenocytes in vitro role of the phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 32, p. 28556-28566, 2011. ISSN 0021-9258.
- BURGOS-MORÓN, E. et al. The dark side of curcumin. **International journal of cancer**, v. 126, n. 7, p. 1771-1775, 2010. ISSN 1097-0215.
- BURTIS CA, ASHWOOD ER. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1994.
- CAVAILLON, J. M. Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. **Cytokine cascade in sepsis. Scand J Infect Dis**, v. 35, p. 535-544, 2003.
- CECCONI, M. et al. Sepsis and septic shock. **The Lancet**, v. 392, n. 10141, p. 75-87, 2018. ISSN 0140-6736. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30696-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30696-2)>. Acesso em: 2019/04/06.
- CHAI, Z. et al. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 1, p. 311-316, 1996. ISSN 0022-1007.
- CHAN, J. K. et al. Alarmins: awaiting a clinical response. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 8, p. 2711-2719, 2012. ISSN 0021-9738.
- CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826, 2010. ISSN 1474-1741.
- CHONG, D. L. W.; SRISKANDAN, S. Pro-inflammatory mechanisms in sepsis. In: (Ed.). **Sepsis-Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Responses**: Karger Publishers, v.17, 2011. p.86-107.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-91, Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.
- CONTE, D. et al. Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 2, p. 699-708, 2006. ISSN 0270-7306.
- CUZZOCREA, S. et al. Role of interleukin-6 in a non-septic shock model induced by zymosan. **European Cytokine Network**, v. 10, n. 2, p. 191-204, 1999. ISSN 1148-5493.
- CUZZOCREA, S. et al. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 9, p. 5094-5104, 1999. ISSN 0022-1767.

DAHANUKAR, S. A.; KULKARNI, R. A.; REGE, N. N. Pharmacology of medicinal plants and natural products. **Indian journal of pharmacology**, v. 32, n. 4, p. S81-S118, 2000. ISSN 0253-7613.

DANNA, D. M. Hospital Costs Associated with Sepsis Compared with Other Medical Conditions. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 389-398, 2018/09/01/ 2018. ISSN 0899-5885. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899588518309547> >.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Crit Care Med**, v. 32, n. 3, p. 858-73, Mar 2004. ISSN 0090-3493 (Print) 0090-3493.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Crit Care Med**, v. 36, n. 1, p. 296-327, Jan 2008. ISSN 1530-0293 (Electronic) 0090-3493 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18158437 >.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. **Intensive care medicine**, v. 39, n. 2, p. 165-228, 2013. ISSN 0342-4642.

DI MEO, S. et al. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016. ISSN 1942-0900.

EL-BENNA, J. et al. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. **Immunological reviews**, v. 273, n. 1, p. 180-193, 2016. ISSN 0105-2896.

EPSTEIN, J.; SANDERSON, I. R.; MACDONALD, T. T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 11, p. 1545-1557, 2010. ISSN 0007-1145. Disponível em: < <https://www.cambridge.org/core/article/curcumin-as-a-therapeutic-agent-the-evidence-from-in-vitro-animal-and-human-studies/225164D1A70D11C765C147A5CD022200> >.

ESTRELA, J. M. et al. Polyphenolic phytochemicals in cancer prevention and therapy: bioavailability versus bioefficacy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 60, n. 23, p. 9413-9436, 2017. ISSN 0022-2623.

EVANS, T. et al. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. **Circulatory shock**, v. 41, n. 2, p. 77-81, 1993. ISSN 0092-6213.

FAHLMAN, C. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) potently enhances in vitro macrophage production from primitive murine hematopoietic progenitor cells in combination with stem cell factor and interleukin-7: novel stimulatory role of p55 TNF receptors. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1528-1533, 1994. ISSN 0006-4971.

FIGUEIREDO, M. J. et al. Febrile response induced by cecal ligation and puncture (CLP) in rats: involvement of prostaglandin E 2 and cytokines. **Medical microbiology and immunology**, v. 201, n. 2, p. 219-229, 2012. ISSN 0300-8584.

FRAZIER, W. J.; HALL, M. W. Immunoparalysis and adverse outcomes from critical illness. **Pediatric clinics of North America**, v. 55, n. 3, p. 647-xi, 2008. ISSN 0031-3955. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18501759> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2474674/> >.

FRITSCHÉ, G. et al. Regulatory interactions between iron and nitric oxide metabolism for immune defense against Plasmodium falciparum infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 9, p. 1388-1394, 2001. ISSN 1537-6613.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 787-809, 2008. ISSN 0006-2952.

GOGOS, C. A. et al. Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 1, p. 176-180, 2000. ISSN 1537-6613.

GUIMARÃES, M. R. et al. Curcumin abrogates LPS-induced pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. Evidence for novel mechanisms involving SOCS-1, -3 and p38 MAPK. **Archives of oral biology**, v. 58, n. 10, p. 1309-1317, 2013. ISSN 1879-1506 0003-9969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011306> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4030384/> >.

H FARZAEI, M.; RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. The role of dietary polyphenols in the management of inflammatory bowel disease. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 196-210, 2015. ISSN 1389-2010.

HAMPL, V. Determination of Nitric Oxide by the. **Methods in nitric oxide research**, p. 309, 1996. ISSN 0471955248.

HASAN, S. T. et al. Curcumin modulation of high fat diet-induced atherosclerosis and steatohepatosis in LDL receptor deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 232, n. 1, p. 40-51, 2014. ISSN 0021-9150.

HUANG, G. et al. Curcumin protects against collagen-induced arthritis via suppression of BAFF production. **Journal of clinical immunology**, v. 33, n. 3, p. 550-557, 2013. ISSN 0271-9142.

ILAS- Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse. Sepse: um problema de saúde pública. **Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse**. Brasília:90 p. ISBN 978-85-87077-40-0. CFM, 2015

ILAS- Instituto Latino-Americano. Implementação de Protocolo Gerenciado de Sepse Protocolo Clínico. Disponível em: <https://www.ilas.org.br/assets/arquivos/ferramentas/protocolo-de-tratamento.pdf>, 2018.

JAIMES, F. A literature review of the epidemiology of sepsis in Latin America. **Rev Panam Salud Publica**, v. 18, n. 3, p. 163-71, Sep 2005. ISSN 1020-4989 (Print) 1020-4989 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16269118 >.

JANGRA, A. et al. Piperine augments the protective effect of curcumin against lipopolysaccharide-induced neurobehavioral and neurochemical deficits in mice. **Inflammation**, v. 39, n. 3, p. 1025-1038, 2016. ISSN 0360-3997.

JON J, TINTINALLI JE, RUIZ E, et al. Choque séptico: emergências médicas. 4^a ed. Washington: **American College of Emergency Physicians**; 1996. p.200-8.

JÚNIOR, J. et al. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 9-17, 2006.

JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. **Alternative medicine review**, v. 14, n. 2, 2009. ISSN 1089-5159.

KIM, G.-Y. et al. Curcumin Inhibits Immunostimulatory Function of Dendritic Cells: MAPKs and Translocation of NF- κ B as Potential Targets. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 8116, 2005. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/174/12/8116.abstract> >.

KOJIMA, H. et al. Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 21, p. 3209-3212, 1999. ISSN 1433-7851.

KUMAR, G. et al. Nationwide Trends of Severe Sepsis in the 21st Century (2000–2007). **Chest**, v. 140, n. 5, p. 1223-1231, 2011/11/01/ 2011. ISSN 0012-3692. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012369211605898> >.

KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1325-1348, 2017. ISSN 1476-5381.

KUSHNER, I.; RZEWNICKI, D. L. The acute phase response: general aspects. **Bailliere's clinical rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 513-530, 1994. ISSN 0950-3579.

LAMPROPOULOU, I. T. et al. TNF- α and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of diabetes research**, v. 2014, 2014. ISSN 2314-6745.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Medicine**, v. 29, n. 4, p. 530-538, 2003. ISSN 0342-4642.

MACHADO, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017. ISSN 1473-3099.

MANCUSO, C.; BARONE, E. Curcumin in clinical practice: myth or reality? **Trends in pharmacological sciences**, v. 30, n. 7, p. 333-334, 2009. ISSN 0165-6147.

- MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, 2003. ISSN 0028-4793.
- MARTINS, R. M. et al. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. **Food research international**, v. 50, n. 2, p. 657-663, 2013. ISSN 0963-9969.
- MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF CURCUMIN. In: AGGARWAL, B. B.; SURH, Y.-J., et al (Ed.). **The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease**. Boston, MA: Springer US, 2007. p.105-125. ISBN 978-0-387-46401-5.
- MOHAMMADI, S. et al. The effect of curcumin on TNF- α , IL-6 and CRP expression in a model of polycystic ovary syndrome as an inflammation state. **Journal of reproduction & infertility**, v. 18, n. 4, p. 352, 2017.
- MOLLEN, K. P. et al. Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. v. 26, n. 5, p. 430-437, 2006. ISSN 1073-2322.
- MOMTAZI-BOROJENI, A. A. et al. Curcumin: A natural modulator of immune cells in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity reviews**, v. 17, n. 2, p. 125-135, 2018. ISSN 1568-9972.
- MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual review of immunology**, v. 19, n. 1, p. 683-765, 2001. ISSN 0732-0582.
- NAGAI, Y. et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. **Nature immunology**, v. 3, n. 7, p. 667, 2002. ISSN 1529-2916.
- NASA, P.; JUNEJA, D.; SINGH, O. Severe sepsis and septic shock in the elderly: An overview. **World J Crit Care Med**, v. 1, n. 1, p. 23-30, 2012.
- NILIUS, B.; APPENDINO, G. Spices: the savory and beneficial science of pungency. In: (Ed.). **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 164**: Springer, 2013. p.1-76.
- OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. **Critical care medicine**, v. 30, n. 1, p. S58-S63, 2002. ISSN 0090-3493.
- PATHAN, N. et al. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. **The Lancet**, v. 363, n. 9404, p. 203-209, 2004. ISSN 0140-6736.
- PAVKOV, M. E. et al. Elevation of circulating TNF receptors 1 and 2 increases the risk of end-stage renal disease in American Indians with type 2 diabetes. **Kidney international**, v. 87, n. 4, p. 812-819, 2015. ISSN 0085-2538.
- PEREIRA, F. H.; BATALHÃO, M. E.; CÁRNIO, E. C. Correlation between body temperature, blood pressure and plasmatic nitric oxide in septic patients. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 22, n. 1, p. 123-128, 2014. ISSN 0104-1169.

- POLK, H. C., JR. et al. A systematic study of host defense processes in badly injured patients. **Ann Surg**, v. 204, n. 3, p. 282-99, Sep 1986. ISSN 0003-4932 (Print) 0003-4932.
- POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-2088, 1998. ISSN 0036-8075.
- POYLIN, V. et al. The NF- κ B Inhibitor Curcumin Blocks Sepsis-Induced Muscle Proteolysis. **Mediators of inflammation**, v. 2008, 2008. ISSN 0962-9351.
- PREISER, J.-C. et al. Interleukin-6 administration has no acute hemodynamic or hematologic effect in the dog. **Cytokine**, v. 3, n. 1, p. 1-4, 1991. ISSN 1043-4666.
- PRIYADARSINI, K. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091-20112, 2014.
- RAHIMNIA, A. R. et al. Impact of supplementation with curcuminoids on systemic inflammation in patients with knee osteoarthritis: findings from a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Drug research**, v. 65, n. 10, p. 521-525, 2015. ISSN 2194-9379.
- RANGEL-FRAUSTO, M. S. Sepsis: still going strong. **Archives of medical research**, v. 36, n. 6, p. 672-681, 2005. ISSN 0188-4409.
- REED, M. J. et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 49, n. 11, p. 1390-1394, 2000. ISSN 0026-0495.
- REINHART, K. et al. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. **N Engl J Med**, v. 377, n. 5, p. 414-417, Aug 3 2017. ISSN 0028-4793.
- ROSSOL, M. et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical ReviewsTM in Immunology**, v. 31, n. 5, 2011. ISSN 1040-8401.
- RUSSELL, J. A. Management of Sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 16, p. 1699-1713, 2006/10/19 2006. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://doi.org/10.1056/NEJMra043632> >. Acesso em: 2019/04/28.
- SANDUR, S. K. et al. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). **Free radical biology and medicine**, v. 43, n. 4, p. 568-580, 2007. ISSN 0891-5849.
- SAVCUN, G. Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin against hepatorenal oxidative injury in the experimental sepsis model created in rats. **Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery**, v. 19, n. 6, p. 507-515, 2013.
- SERAFINI, M. M. et al. Curcumin in Alzheimer's disease: Can we think to new strategies and perspectives for this molecule? **Pharmacological research**, v. 124, p. 146-155, 2017. ISSN 1043-6618.

SIDDIQUI AM1, CUI X, WU R, DONG W, ZHOU M, HU M, SIMMS HH, WANG P. The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Crit Care Med.** 2006 Jul;34(7):1874-82.

SHISHODIA, S. et al. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF- κ B activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. **Biochemical pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 700-713, 2005. ISSN 0006-2952.

SILVA, L. S. D. et al. Curcumin suppresses inflammatory cytokines and heat shock protein 70 release and improves metabolic parameters during experimental sepsis. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 269-276, 2017. ISSN 1388-0209.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock. **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287> >. Acesso em: 5/12/2019.

SONG, Y. et al. Curcumin protects mice from coxsackievirus B3-induced myocarditis by inhibiting the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt/nuclear factor- κ B pathway. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, v. 18, n. 6, p. 560-569, 2013. ISSN 1074-2484.

STABILE, A. M. et al. Central but not systemic inhibition of inducible nitric oxide synthase modulates oxytocin release during endotoxemic shock. **Peptides**, v. 31, n. 4, p. 706-711, 2010. ISSN 0196-9781.

STABILE, A. M. et al. Differential role of neurohypophysial hormones in hypotension and nitric oxide production during endotoxaemia. **Journal of neuroendocrinology**, v. 28, n. 6, 2016. ISSN 0953-8194.

STEENSEN, T. B.; ALEXIS, N. E.; SIKKELAND, L. I. B. Isolating and culturing of sputum macrophages: A potential ex vivo/in vitro model AU - Bølling, Anette Kocbach. **Experimental Lung Research**, p. 1-11, 2018. ISSN 0190-2148. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/01902148.2018.1539788> >.

SUGARMAN, B. J. et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. **Science**, v. 230, n. 4728, p. 943-945, 1985. ISSN 0036-8075.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 29, n. 2, p. 159-166, 1997. ISSN 0306-3623.

TORIO, C.; MOORE, B. National inpatient hospital costs: the most expensive conditions by payer, 2013. HCUP statistical brief# 204. **Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs**. Rockville, MD, Agency for Healthcare Research and Quality. Available at: <https://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb204-Most-Expensive-Hospital-Conditions.jsp>. Accessed August, v. 17, 2016.

TORIO, C. M.; ANDREWS, R. M. **National inpatient hospital costs: the most expensive conditions by payer, 2011. HCUP Statistical Brief# 160. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; August 2013** 2016.

TU, C.-T. et al. Curcumin protects mice against concanavalin A-induced hepatitis by inhibiting intrahepatic intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and CXCL10 expression. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 358, n. 1-2, p. 53-60, 2011. ISSN 0300-8177.

USHARANI, P. et al. Effect of NCB-02, atorvastatin and placebo on endothelial function, oxidative stress and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus. **Drugs in R & D**, v. 9, n. 4, p. 243-250, 2008. ISSN 1174-5886.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 2007. ISSN 0100-4042.

VINCENT, J.-L. et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **Jama**, v. 302, n. 21, p. 2323-2329, 2009. ISSN 0098-7484.

WIERSINGA, W. J. et al. Host innate immune responses to sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 36-44, 2014. ISSN 2150-5594.

WITSELL, A. L.; SCHOOK, L. B. Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth regulator during macrophage differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 10, p. 4754-4758, 1992. ISSN 0027-8424.

WONG, M.-L. et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. **Nature medicine**, v. 2, n. 5, p. 581, 1996. ISSN 1546-170X.

WRIGHT, J. S. Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 591, n. 1-3, p. 207-217, 2002. ISSN 0166-1280.

YANG, Y. et al. The effect of comorbidity and age on hospital mortality and length of stay in patients with sepsis. **Journal of critical care**, v. 25, n. 3, p. 398-405, 2010. ISSN 0883-9441.

YU, S. et al. Curcumin exerts anti-inflammatory and antioxidative properties in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺)-stimulated mesencephalic astrocytes by interference with TLR4 and downstream signaling pathway. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 4, p. 697-705, 2016. ISSN 1355-8145.

YU, Y. et al. Anti-inflammatory effects of curcumin in microglial cells. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 386, 2018. ISSN 1663-9812.

ZHOU, T. et al. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n. 2, p. 349-356, 2013. ISSN 0001-6357.

ZHU, X. et al. Curcumin alleviates neuropathic pain by inhibiting p300/CBP histone acetyltransferase activity-regulated expression of BDNF and cox-2 in a rat model. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91303, 2014. ISSN 1932-6203.

ANEXO I

ANEXO I – AUTORIZAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Centro Colaborador da OPAS/OMS para o Desenvolvimento da Pesquisa em Enfermagem



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - CEP: 14040-902
Fone: 55 16 3315-3382 - 55 16 3315-3381 - Fax: 55 16 3315-0518
www.eerp.usp.br - eerp@usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - ceua@eerp.usp.br

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeito da curcumina sobre a resposta inflamatória estimulada pelo LPS *in vivo* e em cultura de macrófagos peritoneais”, registrada sob nº 19.1.277.22.3, sob a responsabilidade de Angelita Maria Stabile e Geysel Cristina Silva de Aguiar, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada *ad referendum* em 17/05/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (CEUA-EERP/USP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	17/05/2019 a 30/10/2019
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogênico Wistar Hannover
Nº de animais	62
Peso/Idade	250 gramas / 45 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 17 de maio de 2019.

Gabriela Silva Bisson
Profa. Dra. Gabriela Silva Bisson
 Presidente da CEUA-EERP/USP