

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
FISIOPATOLOGIA

ELOUISA BRINGHENTTI

Efeito antioxidante e anti-inflamatório da curcumina sobre o íleo, fígado,
pulmão e rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal

Maringá
2018

ELOUISA BRINGHENTTI

Efeito antioxidante e anti-inflamatório da curcumina sobre o íleo, fígado, pulmão e rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia
Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Nilza Cristina Buttow

Maringá
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

B858e Bringhentti, Elouisa
Efeito antioxidante e anti-inflamatório da curcumina sobre o íleo, fígado, pulmão e rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal / Elouisa Bringhentti. -- Maringá, 2018.
51 f. : il. color., figs.

Orientador: Prof^a Dr^a Nilza Cristina Buttow.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, 2018.

1. Estresse oxidativo. 2. Inflamação. 3. Curcumina. 4. Neurônios nitrérgicos. 5. Isquemia intestinal. I. Buttow, Nilza Cristina, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia. III. Título.

CDD 23.ed. 616.0756

Síntique Raquel de C. Eleuterio - CRB 9/1641

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELOUISA BRINGHENTTI

Efeito antioxidante e anti-inflamatório da curcumina sobre o íleo, fígado, pulmão e rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Nilza Cristina Buttow
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a Dr^a Larissa Carla Lauer Schneider
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Livia Bracht
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Éder Paulo Belato Alves
Universidade Federal de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Santi Rampazzo
Universidade Federal de Sergipe

Aprovada em: 11 de dezembro de 2018.

Local de defesa: Sala 102, Bloco H-79, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

Nenhuma batalha é vencida sozinha. Percebemos isso no momento em que olhamos para trás e nos damos conta da quantidade de pessoas que fizeram a busca pelos nossos sonhos mais fácil e prazerosa. No final, tudo que nos resta é agradecer.

Agradeço primeiramente à minha família, minha mãe Eliane, meu pai Edemir e minha irmã Bianca. São meu bem maior, sem eles nada seria possível. Obrigada por todo o apoio, por me deixarem livre para fazer minhas escolhas, sempre confiando na educação que me proporcionaram. Obrigada pelo amor incondicional e pela confiança que tem em mim. Amo vocês.

Ao meu amor, Guilherme. Obrigada por todo amor e carinho que compartilhamos e por ser essa pessoa incrível, que me faz querer ser melhor. Obrigada por me incentivar sempre e por celebrar comigo minhas pequenas conquistas. Você fez tudo ser mais fácil, até nos momentos mais difíceis. Eu amo você.

Minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Nilza Cristina Buttow, por quem tenho grande admiração. Agradeço a confiança e paciência de me ouvir e compartilhar comigo sua sabedoria. Obrigada por me aceitar como orientanda e por me fazer sempre enxergar além.

Obrigada aos meus amigos, em especial, Analine e Lucas, por tornarem essa caminhada mais leve e agradável, sempre presentes nos momentos mais importantes, dividindo as alegrias e tristezas da pós-graduação. Foram a minha família em Maringá, foi maravilhoso tê-los por perto e poder contar com vocês.

Agradeço à todos os colegas e amigos do Laboratório de Histologia, em especial, Stephanie, Camila, Júlia, Jéssica, Lilian e Pedro, por me acolherem de forma carinhosa. Por discutir ideias e contribuir de forma tão importante para este trabalho. Obrigada por serem sempre prestativos e atenciosos e por me ensinarem a importância de ajudar-nos uns aos outros. Agradeço também as técnicas do laboratório, Maria Ângela e Silvia, por não medirem esforços para nos ajudar e ensinar, vocês fizeram toda a diferença.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar a minha pesquisa e fornecer uma bolsa para que eu pudesse me dedicar exclusivamente a este projeto.

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF), pela oportunidade de aprendizado e crescimento. Aos professores que tive neste período, pelos ensinamentos que levarei para a vida toda.

Por fim, agradeço aos membros titulares e suplentes da banca por aceitarem o convite e contribuírem para melhorar este trabalho.

Efeito antioxidante e anti-inflamatório da curcumina sobre o íleo, fígado, pulmão e rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal

RESUMO

A isquemia e reperfusão (IR) intestinal é caracterizada pela diminuição do fluxo sanguíneo no órgão, condição que leva o mesmo ao desenvolvimento de estresse oxidativo e inflamação. A IR intestinal também pode provocar o aumento da permeabilidade da barreira epitelial intestinal e permitir a translocação bacteriana e a passagem de substâncias para a corrente sanguínea, podendo causar inflamação sistêmica e falência múltipla de órgãos. A curcumina é uma substância natural, que possui atividade antioxidante e anti-inflamatória, com potencial para prevenir os efeitos deletérios causados pela IR. O objetivo deste trabalho foi investigar a ação da curcumina sobre o estresse oxidativo e processo inflamatório no íleo, fígado, pulmão e rim e sobre as alterações neuronais no plexo mientérico de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal. 30 ratos *Wistar* foram divididos em 5 grupos, controle (C), *sham* controle (SC), *sham* tratado (ST), isquêmico controle (IC) e isquêmico tratado (IT). A artéria mesentérica superior foi ocluída por 45 minutos para o estabelecimento da isquemia, e o tempo de reperfusão foi de 72 horas. Os animais foram tratados via oral com 40mg/kg de peso corporal de curcumina 30 minutos antes da cirurgia e diariamente durante o tempo de reperfusão. Foi realizada a análise das atividades enzimáticas da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona s-transferase (GST), mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-glicosaminidase (NAG) e os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e glutatona reduzida (GSH) no íleo, fígado, pulmão e rim e os níveis de nitrito no íleo, além da análise quantitativa e morfométrica dos neurônios nitrérgicos (nNOS⁺) do plexo mientérico. Foi observada a ocorrência de estresse oxidativo e inflamação nos órgãos estudados e alterações na densidade e no perfil neuronal de nNOS⁺. A isquemia intestinal de 45 minutos seguida de reperfusão de 72 horas promove estresse oxidativo e inflamação no íleo, fígado, pulmão e rim de ratos *Wistar*. A curcumina preveniu as alterações da maioria dos parâmetros alterados após a IR intestinal, demonstrando atividade antioxidante e anti-inflamatória.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Inflamação. Neurônios nitrérgicos.

Antioxidant and anti-inflammatory effect of curcumin on the ileum, liver, lung and kidney of rats submitted to intestinal ischemia and reperfusion

ABSTRACT

Intestinal ischemia and reperfusion (IR) are the decrease in blood flow to the organ due to a pathological process, that leads to the development of oxidative stress and inflammation. Increased permeability of the intestinal epithelial barrier allows bacterial translocation and passage of substances into the bloodstream, which can lead to systemic inflammation and multiple organ failure. Curcumin is a natural substance that has antioxidant and anti-inflammatory activity, with potential to prevent the deleterious effects of IR. The objective of this work was to investigate the action of curcumin on oxidative stress and inflammatory process in the ileum, liver, lung and kidney and on neuronal changes in the myenteric plexus of Wistar rats submitted to intestinal ischemia and reperfusion. 30 Wistar rats were divided into 5 groups, control (C), sham control (SC), treated sham (ST), ischemic control (CI) and treated ischemic (IT). The superior mesenteric artery was occluded for 45 minutes for the establishment of ischemia, and the reperfusion duration was 72 hours. Animals were treated orally with 40 mg/kg body weight of curcumin 30 minutes prior to surgery and during the reperfusion. It was evaluated the enzymatic activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione-s-transferase (GST), myeloperoxidase (MPO), n-acetyl-glycosaminidase (NAG), and lipid hydroperoxide (LOOH) and glutathione reduced (GSH) levels present in the ileum, liver, lung and kidney and nitrite levels in the ileum. In addition, the quantitative and morphological analysis of the nitrenergic neurons (nNOS+) was performed in the myenteric plexus. It was observed the occurrence of oxidative stress and inflammation in the organs and changes in the density and neuronal profile of nNOS+. The 45-minute intestinal ischemia followed by 72-hour reperfusion promotes oxidative stress and inflammation in the ileum, liver, lung and kidney of Wistar rats. Curcumin prevented alterations in most of the altered parameters after intestinal IR, demonstrating antioxidant and anti-inflammatory activity.

Keywords: Oxidative stress. Inflammation. Nitrenergic neurons.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Sistema Nervoso Entérico	10
Figura 2 Estrutura química da curcumina.....	14

Dissertação elaborada e formatada conforme
as normas das publicações científicas: *Life
Sciences*

Disponível em:

[https://www.journals.elsevier.com/life-
sciences](https://www.journals.elsevier.com/life-sciences)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	8
ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL	8
SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO	9
ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMAS ANTIOXIDANTES	10
PROCESSO INFLAMATÓRIO	12
REPERCUSSÕES SISTÊMICAS	13
CURCUMINA.....	14
JUSTIFICATIVA	15
OBJETIVOS.....	16
Referências Bibliográficas:.....	16
CAPÍTULO II.....	22
Curcumina promove efeito antioxidante e anti-inflamatório no íleo, fígado, pulmão e rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal.....	23
CAPÍTULO III	50
CONCLUSÕES	50
PERSPECTIVAS FUTURAS	51

CAPÍTULO I

ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

A isquemia intestinal ou mesentérica é a restrição patológica do fornecimento sanguíneo no intestino delgado, condição que estabelece um desequilíbrio metabólico no órgão, caracterizando hipóxia tecidual, seguida de lesão celular (1). A isquemia intestinal pode ser oclusiva, sendo as etiologias mais frequentes a embolia arterial mesentérica (50%) e trombose arterial mesentérica (15-25%), ou não-oclusiva, choque hemorrágico e hipovolêmico (2-3). Embora sua incidência seja relativamente baixa (0,09 a 0,2% das admissões nas unidades emergenciais), sua taxa de mortalidade é elevada (50-80%) (4-6).

Durante a fase inicial da isquemia ocorre lesão da mucosa intestinal. O déficit de oxigênio altera a permeabilidade microvascular, através da redução da atividade da adenilato ciclase, enzima que catalisa a transformação da molécula adenosina trifosfato (ATP) em adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), um importante mediador responsável pelo crescimento e diferenciação celular (7), que parece estar diretamente ligado à manutenção da permeabilidade vascular. Baixas concentrações de AMPC aumentam a permeabilidade capilar, causando extravasamento de líquidos para o meio intersticial e consequente edema no órgão (8).

No momento em que o fluxo sanguíneo é reestabelecido (reperfusão) ocorre a exacerbação da lesão causada pela hipóxia. Parks e Granger (9) demonstraram que três horas de isquemia seguidas por uma hora de reperfusão determinam maior lesão na mucosa intestinal do que quatro horas exclusivas de isquemia. Durante a reperfusão ocorre a intensa produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), produzindo estresse oxidativo e sobrecarregando os sistemas antioxidantes (10).

A isquemia e reperfusão (IR) intestinal possui a capacidade de causar inflamação no órgão, que ativa e recruta células do sistema imune, intensificando a lesão tecidual (11). Além disso, o aumento da permeabilidade vascular e a ruptura da barreira mucosa causam translocação bacteriana. Ao atingirem a corrente sanguínea, os produtos bacterianos podem produzir sepse, choque e falência múltipla de órgãos (14). Pode ainda afetar a capacidade de absorção do intestino, causando deficiências nutricionais (13,14) e promover alterações morfológicas na parede intestinal e perturbações no sistema nervoso entérico (SNE),

modificando a função neuronal e a expressão de neurotransmissores, o que pode afetar, entre outros fatores, a motilidade gastrointestinal (15).

SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) inclui uma série de circuitos neuronais que funcionam de forma relativamente independente do Sistema Nervoso Central (SNC) e são responsáveis pelo controle das funções intestinais, que incluem o fluxo sanguíneo local, absorção e secreção, modulação imune, funções endócrinas e motoras (16), além disso, contribui para a manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal, juntamente com as células da glia (17). O SNE é composto por pequenos agregados de células nervosas ou gânglios neuronais e suas conexões e fibras nervosas efectoras, que ficam em contato com os músculos da parede intestinal, barreira epitelial, vasos sanguíneos e células endócrinas (18).

O SNE está organizado basicamente em plexos ganglionares (Figura 1), o plexo mientérico (de Auerbach) está presente entre as camadas longitudinal e circular da musculatura externa, em toda a extensão do trato gastrointestinal, enquanto o plexo submucoso (de Meissner) é basicamente restrito ao intestino delgado e grosso (16). Diferentes tipos de neurônios com diferentes códigos químicos compõem o SNE, incluindo neurônios motores (excitatórios e inibitórios da musculatura circular, longitudinal e mucosa) interneurônios ascendentes e descendentes, neurônios sensoriais (químico/mecanorreceptores da mucosa) e neurônios secretomotores/vasodilatadores, que liberam óxido nítrico (NO), acetilcolina (Ach), ácido gama-aminobutírico (GABA), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), calretinina, entre outros neurotransmissores.

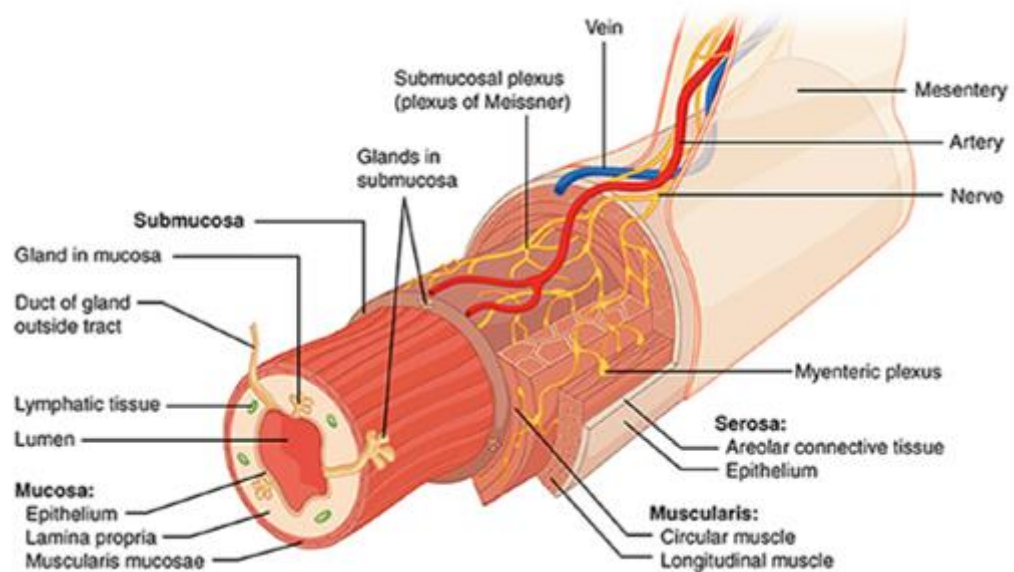


Figura 1 – Sistema Nervoso Entérico (Fonte: Kulkarni et al., 2018)

ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMAS ANTIOXIDANTES

O conceito de que os derivados da xantina oxidase são os principais responsáveis pelos efeitos deletérios ao tecido após a IR foi proposto em 1981 (19), e confirmado através de estudos utilizando inibidores desta enzima (20).

A restrição de oxigênio inibe a fosforilação oxidativa mitocondrial e ocasiona a diminuição na produção de ATP. Entretanto, o ATP remanescente continua sendo transformado em adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) e, posteriormente, em adenosina, inosina e hipoxantina. Além disso, ocorre um aumento de Na^+ intracelular devido à falência da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+), dependente da energia liberada pela quebra do ATP em ADP, gerando edema celular e influxo de Ca^{++} para o citosol. O acúmulo de Ca^{++} ativa a protease calpaína, que promove a quebra de uma ponte peptídica da enzima xantina desidrogenase (XD), que é rapidamente convertida em xantina oxidase (XO), enzima que necessita de oxigênio (O_2) para converter a hipoxantina em xantina (21). A hipoxantina é acumulada durante a isquemia e, no momento da reperfusão, o fornecimento de oxigênio possibilita a ação da XO, que oxida a hipoxantina em xantina e tem como produto final o ácido úrico. Entretanto, esta reação tem como subproduto o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), uma EROs altamente deletéria para as células (22).

O radical superóxido é instável e está presente em grandes quantidades após a isquemia e reperfusão (IR). Ele pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ainda promover a liberação do íon ferroso da ferritina. Na presença de ferro, através da reação de Fenton, o

H_2O_2 é transformado no radical hidroxila (OH^\cdot) (23). O radical hidroxila, em especial, inicia a peroxidação lipídica, que causa alterações na membrana e permeabilidade celular. Os radicais lipídicos liberados pela reação de peroxidação, além de serem espécies reativas, iniciam a redução de outros ácidos lipídicos. A perda da seletividade da membrana provoca a liberação dos constituintes celulares, como enzimas hidrolíticas lisossomais, e a produção de compostos citotóxicos, resultando em morte celular (24).

Os agentes óxido-redutores, como as EROs, são normalmente produzidos como consequência direta do metabolismo do O_2 . Em condições não-fisiológicas, a quantidade de EROs sobrepõe a capacidade das defesas antioxidantes endógenas, das quais fazem parte enzimas e substâncias redutoras (22). Na primeira linha de defesa antioxidante estão presentes as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Existem duas formas de SOD, a SOD-cobre-zinco, presente principalmente no citosol e a SOD-manganês, localizada principalmente na mitocôndria. A SOD catalisa a conversão do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ , enquanto a CAT, um hemoproteína citoplasmática, catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 (25).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tiol (-SH) presente em abundância no meio intracelular. Sua atividade antioxidante está relacionada a sua capacidade redutora, determinada pelo grupamento -SH presente na cisteína (26). Para que a atividade protetora da glutathiona, expressa pela redução de espécies oxidantes, e consequente oxidação da GSH à glutathiona dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através de um ciclo catalítico, que envolve a ação de três enzimas, a glutathiona oxidase (GO), a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a glutathiona redutase (GR). A GSH protege o tecido contra as lesões produzidas após a IR, de forma direta, através da redução das espécies radiculares, ou mesmo atuando como cofator de outras enzimas antioxidantes (27).

As glutathionas-transferases (GSTs) compreendem uma família de enzimas envolvidas principalmente no metabolismo de xenobióticos, incluindo drogas, pesticidas, herbicidas, poluentes ambientais e substâncias carcinogênicas (28), além disso participam da detoxificação de produtos gerados pelo estresse oxidativo. As GSTs reduzem fosfolipídios, ácidos graxos e hidroperóxidos de colesterol, produtos de vida curta derivados da peroxidação das membranas lipídicas pelas EROs, impedindo sua quebra em eletrófilos secundários, tais como epóxidos e carbonilas reativas, que são considerados genotóxicos (29).

PROCESSO INFLAMATÓRIO

A perturbação das junções entre as células epiteliais da camada mucosa, somada à produção acentuada de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica após a IR intestinal, possuem a capacidade de recrutar e ativar neutrófilos, dando início a um processo inflamatório, inicialmente, local. A ação das células imunes é regulada por quimiotáticos (C5a, IL-8, LTB₄, PAF), produzidos durante a IR intestinal, e pela expressão aumentada de moléculas de adesão presentes na superfície das células imunes, células endoteliais vasculares, lâmina própria e tecido conjuntivo. As moléculas de adesão responsáveis pela interação dos leucócitos com as células epiteliais são as selectinas, integrinas b2 (CD11/CD18) e imunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) e quando são superexpressas, provocam uma maior adesão de células imunes (31).

Durante a IR intestinal também são ativadas proteínas quinases que acionam fatores de transcrição (PA-1 e NFκB), responsáveis por regular a expressão de genes pró-inflamatórios, produzindo enzimas (iNOS, fosfolipase A₂, ciclooxigenase), citocinas (TNF-α, IL-1, IL-6) e moléculas de adesão (ICAM-1) (31). A ativação de vias de transcrição são mediadas pela ligação aos receptores tipo Toll (TLRs). Esses receptores podem ser ativados tanto por antígenos microbianos (padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs) ou por substâncias não-microbianas (padrões moleculares associados a danos - DAMPs) (32). Muitos DAMPs são constituintes intracelulares, que são liberados para o meio extracelular após a lesão, ou substâncias geradas pela ação das EROs aos componentes celulares (33).

Existem evidências de que a lesão tecidual após IR intestinal pode ainda ser mediada pela ativação do sistema complemento (34), pela ação dos mastócitos (35) e acúmulo de plaquetas (36).

Entre as substâncias produzidas durante a IR intestinal destaca-se o óxido nítrico (NO), sintetizado pela NO sintase (NOS) a partir da L-arginina. A NOS existe em três isoformas, a NOS endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS), sendo a última diretamente ligada à resposta imune (34). Em concentrações normais o NO possui, entre outros, efeitos vasodilatadores no sistema microvascular. Entretanto, em grandes quantidades pode estar envolvido com a produção de radicais citotóxicos (37). O aumento nas concentrações de NO está relacionada com o estímulo da transcrição da iNOS através da ativação principalmente do fator NFκB (38).

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da inflamação e é reconhecido que sua infiltração é a maior causa de lesão tecidual associada a doenças inflamatórias intestinais (39). Os neutrófilos ativados se aderem ao epitélio e promovem lesão através da liberação de radicais livres, enzimas proteolíticas e peroxidases (34). Uma das principais peroxidases liberadas pelos neutrófilos é a mieloperoxidase (MPO), uma enzima que catalisa a formação de espécies reativas intermediárias, na presença de H_2O_2 e cloro, bromo e tiocianato, formando ácido hipocloroso (HClO), ácido hipobromoso (HOBr) e ácido hipotiocianoso (HOSCN), respectivamente. Essas substâncias são microbicidas, entretanto, são altamente instáveis e contribuem com o aumento do estresse oxidativo no tecido (39).

Os estímulos inflamatórios ativam também os macrófagos residentes no tecido, que agem através da liberação de citocinas, EROs, indução da atividade da mieloperoxidase e fagocitose (40), além da liberação da enzima lisossomal proteolítica n-acetil-glicosaminidase, importante marcador da ativação de macrófagos (41).

REPERCUSSÕES SISTÊMICAS

O acometimento de órgãos distantes é uma condição frequente após a IR intestinal, podendo afetar os pulmões (42), fígado (43) e rins (44). O aumento da permeabilidade intestinal permite a translocação de produtos bacterianos entéricos e a liberação de espécies reativas e citocinas inflamatórias para a circulação sanguínea, levando ao desenvolvimento de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), que pode progredir para falência múltipla de órgãos (45).

O fígado é o primeiro órgão a ser afetado pela IR intestinal, entretanto sua capacidade de reserva metabólica substancial faz com que as alterações não sejam detectadas a princípio, dificultando o diagnóstico de insuficiência hepática (46). A vascularização hepática está diretamente ligada à intestinal pela veia porta, portanto a oclusão da artéria mesentérica reduz o fluxo sanguíneo no fígado, ocasionando lesão hepática. Entretanto, as alterações encontradas no fígado e no intestino após a IR intestinal são distintas, sugerindo que o fígado responde de forma diferente à reperfusão (47).

O pulmão é um dos órgãos mais afetados. O edema pulmonar agudo, relacionado ao aumento da permeabilidade microvascular para fluídos e proteínas no órgão, e o intenso processo inflamatório local após a IR intestinal, principalmente após a infiltração de neutrófilos

(48) e ativação dos macrófagos alveolares (49), podem contribuir com o desenvolvimento de insuficiência respiratória (50).

Os rins também são susceptíveis à IR intestinal. A redução do fluxo sanguíneo renal e as alterações nos níveis de ATP no tecido, somado as substâncias geradas pelo quadro isquêmico, levam a alteração da atividade dos sistemas antioxidantes e ao recrutamento e ativação de células imunes, causando disfunção nos túbulos renais (51).

CURCUMINA

A cúrcuma (*Curcuma longa*), também conhecida com açafrão-da-terra, é uma planta herbácea da família do gengibre. É utilizada na culinária como tempero e na indústria alimentícia como corante e conservante (52). A curcumina, um polifenol hidrofóbico e principal princípio ativo da cúrcuma, foi isolada pela primeira vez em 1815 por Vogel e Pelletier, desde então têm sido utilizada em diversos estudos (53). Nos últimos 60 anos, mais de 3000 estudos demonstraram a atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-inflamatória da curcumina. Ela exerce efeitos benéficos em doenças degenerativas, artrite, alergia, doença inflamatória intestinal, nefrotoxicidade, AIDS, psoríase, diabetes, entre outras (54).

Evidências indicam que as propriedades apresentadas pela curcumina são resultantes da sua interação com diversos alvos moleculares, incluindo fatores de transcrição, fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e outras. A curcumina pode ligar-se diretamente e modular a atividade destes alvos ou pode regular indiretamente suas funções (55).

A estrutura molecular da curcumina é lipofílica e consiste em dois anéis aromáticos conectados por dois grupos de carbonos insaturados, em consequência disso, possui baixa solubilidade em água. A molécula é estabilizada por ligações de hidrogênio associadas à um grupo hidroxila (OH) central (Figura 2), sendo esta uma região importante, responsável pelas atividades biológicas da curcumina (56). A curcumina possui baixa biodisponibilidade via oral. Ela é instável em pH intestinal, sendo rapidamente metabolizada, conjugada no fígado e excretada nas fezes. Um dos maiores problemas envolvendo o tratamento com curcumina é sua má absorção, que resulta em baixas concentrações no plasma e tecidos, dificultando suas ações terapêuticas (57, 58).

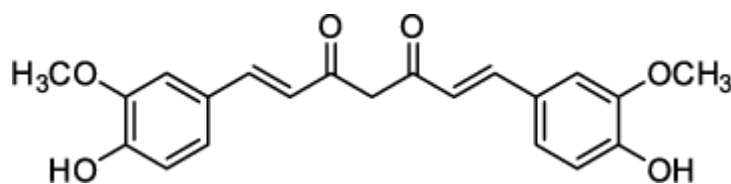


Figura 2 – Estrutura química da curcumina (Fonte: Gomes, 2014)

A curcumina possui ações benéficas sobre as alterações causadas pela IR intestinal, principalmente em decorrência da sua atividade antioxidante e anti-inflamatória. A atividade antioxidante é determinada pela capacidade da curcumina de “varrer” as espécies reativas de oxigênio produzidas em grandes quantidades após o quadro isquêmico, através da doação de elétrons a partir dos anéis fenólicos (59) neutraliza as EROs e impede sua reação com constituintes celulares. Além disso, ela inibe a atividade enzimática da xantina oxidase (60). A curcumina possui a capacidade de modular a atividade de componentes envolvidos no processo inflamatório, incluindo o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B). O NF- κ B é encontrado no citosol associado a um inibidor (I κ B α) e sua ativação é realizada via transdução de sinal, que degrada o I κ B α e o NF- κ B é deslocado para o núcleo, induzindo a expressão de genes importantes para a imunidade inata e adaptativa (61).

A curcumina previne a ativação do NF- κ B através da inibição da degradação do I κ B α em diversos tipos de célula (62). Além disso, a curcumina regula os seguintes mecanismos envolvidos na inflamação (63,64): modulação negativa da COX-2 e iNOS (via supressão do NF- κ B); inibição de citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL-1, -2, -6,-8 e -12), proteína quimiotática de monócitos e fator inibitório da migração de macrófagos (MIF); inibição da lipoxigenase e cicloxigenase (65).

JUSTIFICATIVA

A mortalidade causada pela isquemia e reperfusão intestinal permanece elevada apesar dos avanços nos cuidados com os pacientes. Diversas patologias podem levar à obstrução da circulação sanguínea no órgão e seus efeitos afetam funções básicas do intestino, como absorção, secreção e motilidade gastrointestinal, além disso, as substâncias produzidas atingem órgãos distantes, e podem ocasionar falência múltipla de órgãos. A complexidade das lesões ocasionadas pela IR intestinal e a dificuldade de tratamento tornam necessária a busca por terapias que amenizem o intenso processo oxidativo e inflamatório. A curcumina pode ser uma

alternativa, devido sua ação antioxidante e anti-inflamatória, e pode trazer uma nova perspectiva para o tratamento de situações patológicas envolvendo hipóxia tecidual.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o efeito da administração oral de curcumina sobre o estresse oxidativo e processo inflamatório no íleo, fígado, pulmão e rim e sobre as alterações neuronais no plexo mientérico de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão (IR) intestinal.

ESPECÍFICOS

Analisar o efeito da administração oral de curcumina sobre o estresse oxidativo no íleo, fígado, pulmão e rim promovido pela isquemia de 45 minutos seguida de reperfusão de 72 horas, através da análise de enzimas e substâncias antioxidantes.

Avaliar o efeito da curcumina sobre a inflamação no íleo, fígado, pulmão e rim após a IR intestinal, através da determinação da atividade de enzimas que participam do processo inflamatório.

Avaliar o efeito da curcumina sobre a produção de óxido nítrico no íleo após a IR intestinal, através da quantificação de nitrito.

Avaliar o efeito do tratamento com curcumina sobre a densidade e perfil neuronal da população nitrérgica no plexo mientérico do íleo após isquemia de 45 minutos e reperfusão de 72 horas.

Referências Bibliográficas:

1. Patel A, Kaleya RN, Sammartano RJ. Pathophysiology of mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am.* 1992; 72:31–41.
2. Acosta S. Mesenteric ischemia. *Curr Opin Crit Care.* 2015; 21:171–8.
3. Clair DG, Beach JM. Mesenteric Ischemia. *N Engl J Med.* 2016; 374:959–68.

4. Acosta S, Bjorck M. Acute thrombo-embolic occlusion of the superior mesenteric artery: a prospective study in a well-defined population. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003; 26:179–83.
5. Duran M, Pohl E, Grabitz K, Schelzig H, Sagban TA, Simon F. The importance of open emergency surgery in the treatment of acute mesenteric ischemia. *World J Emerg Surg.* 2015; 26:10–45.
6. Stoney RJ, Cunningham CG. Acute mesenteric ischemia. *Surgery.* 1993;114: 489–90
7. Tresguerres M, Levin LR, Buck J. Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney international.* 2011; 79(12):1277-1288.
8. Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, Brett J, Morrow B, Morris SA, Bilezikian JP, Silverstein SC, Stern D. Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am J Physiol.* 1992; 262(3):546-54.
9. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986; 250(6):749-53.
10. De Souza ACS, Borges SC, Beraldi, EJ, de Sá-Nakanishi AB, Comar JF., Bracht A, Natali MR., Buttow NC. Resveratrol reduces morphologic changes in the myenteric plexus and oxidative stress in the ileum in rats with ischemia/reperfusion injury. *Dig. Dis. Sci.* 2015; 60:3252–3263.
11. Xia G, Martin AE, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor downregulates expression of adhesion molecules and infiltration of inflammatory cells after intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 2003; 38:434-9.
12. Aksoyek S, Cinel I, Avlan D, Cinel L, Ozturk C, Gurbuz P, Nayci A, Oral U: Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock.* 2002; 18(5):476–480.
13. Kuenzler KA, Pearson PY, Schwartz MZ: Interleukin-11 enhances intestinal absorptive function after ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 2002; 37(3):457–459.
14. Prasad R, Alavi K, Schwartz MZ: GLP-2alpha accelerate recovery of mucosal absorptive function after intestinal ischemia reperfusion. *J Pediatr Surg.* 2001; 36(4):570–572.
15. Silva MA, de Meirelles LR, Bustorff-Silva JM. Changes in intestinal motility and in the myenteric plexus in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. *J Pediatr Surg.* 2007; 42(6):1062-5.

16. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012; 9(5):286-94.
17. Review. PubMed PMID: 22392290. *Gastroenterol Hepatol.* 2012 Mar 6;9(5):286-94
Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A. Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil.* 2003; 15(3):239-42.
18. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.* 2000; 81(1-3):87-96
19. McCord, J.M.: Oxygen-derived free radicals in postischaemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 1985; 312:159–163.
20. Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: from equations through membrane protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res.* 1992; 26:641-55.
21. Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age (Omaha)* 1997; 20:127-140.
22. Lee M-C-i, Velayutham M, Komatsu T, Hille R, Zweier JL. Measurement and Characterization of Superoxide Generation from Xanthine Dehydrogenase: A Redox-Regulated Pathway of Radical Generation in Ischemic Tissues. *Biochemistry* 2014; 53:6615-6623.
23. Thomas CE, Morehouse LA, Aust SD. Ferritin and superoxide dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1985; 260: 3275-80.
24. Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol.* 1989; 26: 277-85.
25. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711-60.
26. Mayes PA. Biologic oxidation. *Harper's biochemistry.* 1990; 105-11.
27. Huber PC., Almeida WP, Fátima A. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. *Química Nova.* 2008; 31(5):1170-1179.
28. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995; 30:445–600.
29. Hubatsch I, Ridderström M, Mannervik B. Human glutathione transferase A4-4: an Alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-

- hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem. J.* 1998; 330:175–79.
30. Xia G, Martin AE, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor downregulates expression of adhesion molecules and infiltration of inflammatory cells after intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 2003; 38:434-9.
 31. Attuwaybi BO, Kozar RA, Moore-Olufemi SD, Sato N, Hassoun HT, Weisbrodt NW, Moore FA. Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.* 2004; 118:53-7.
 32. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10:826–837.
 33. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009; 106(48):20388-20393.
 34. Cuzzocrea S, Chatterjee P, Mazzon E, Dugo L, De Sarro A, Van de Loo FAJ, Caputi AP, Thiemermann C. Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury. *Shock.* 2002; 18:169-76.
 35. Zhang M, Austen WGJr, Chiu I, Alicot EM, Hung R, Ma M, Verna N, Xu M, Hechtman HB, Moore FDJr, Carroll MC. Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101:3886-91.
 36. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of Pselectin. *Blood.* 1998; 15:507-15.
 37. Chan KL, Zhang XH, Fung PCW, Guo WH, Tam PKH. Role of nitric oxide in intestinal ischaemia-reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. *Br J Surg.* 1999;86:1427-32.
 38. Montalto MC, Hart ML, Jordan JE, Wada K, Stahl GL. Role for complement in mediating intestinal nitric oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression. *Am J Physiol.* 2003; 285:G197-206.
 39. Wéra O, Lancellotti P, Oury C. The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases. *J Clin Med.* 2016; 17:5(12)
 40. Coates NJ, McColl SR. Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation. *J Immunol* 2001; 166:5176–82.

41. Reiner RG, Tanner AR, Keyhani AH, Wright R. A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury. *Clinical and Experimental Immunology*. 1981; 43(2):376-380.
42. Vinardi S, Pierro A, Parkinson EJ, Vejchapipat P, Stefanutti G, Spitz L, Eaton S. Hypothermia throughout intestinal ischaemia-reperfusion injury attenuates lung neutrophil infiltration. *J Pediatr Surg*. 2003;38:88-91.
43. Horie Y, Yamagishi Y, Kato S, Kajihara M, Kimura H, Ishii H. Low-dose ethanol attenuates gut ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats via nitric oxide production. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18:211-7.
44. Rothenbach P, Turnage RH, Iglesias J, Riva A, Bartula L, Myers SI. Downstream effects of splanchnic ischemiareperfusion injury on renal function and eicosanoid release. *J Appl Physiol*. 1997;83:530-6.
45. Ceppa EP, Fuh KC, Bulkley GB: Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock. *Curr Opin Crit Care*. 2003; 9(2):127–132.
46. Horie Y, Ishii H. Liver dysfunction elicited by gut ischemia-reperfusion. *Pathophysiology*. 2001; 8(1):11-20.
47. Horie Y, Wolf R, Miyasaka M, Anderson DC, Granger DN. Leukocyte adhesion and hepatic microvascular responses to intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Gastroenterology*. 1996; 111(3):666-73.
48. Iglesias JL, Lanoue JL, Rogers TE, Inman L, Turnage RH. Physiologic basis of pulmonary edema during intestinal reperfusion. *J Surg Res*. 1998; 80:156-63.
49. Börjesson A, Wang X., Sun Z, Wallén R, Deng X, Johansson E, Andersson R. Effects of n-acetylcysteine on pulmonary macrophage activity after intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Dig Surg* 2000; 17:379–389.
50. Vasileiou I, Kalimeris K, Nomikos T, Xanthopoulou MN, Perrea D, Agrogiannis G, Nakos G, Kostopanagiotou G. Propofol prevents lung injury following intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res*. 2012; 172(1):146-52.
51. LaNoue JL Jr, Turnage RH, Kadesky KM, Guice KS, Oldham KT, Myers SI. The effect of intestinal reperfusion on renal function and perfusion. *J Surg Res*. 1996; 64(1):19-25.
52. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an ageold spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2009; 30:85–94.
53. Milobedeska J, Kostanecki V, Lampe V. Structure of curcumin. *Ber Dtsch Chem Ges*. 1910; 43:2163–70.

54. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41:40–59.
55. Agrawal DK, Mishra PK. Curcumin and its analogues: potential anticancer agents. *Med Res Rev.* 2010; 30(5):818-60.
56. Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG, Mohan H. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 475-484.
57. Ravindranath V, Chandrasekhara N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology.* 1980; 16: 259-265.
58. Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 853: 183-189.
59. Jankun J, Wyganowska-Świątkowska M, Dettlaff K, Jelińska A, Surdacka A, Wątróbska-Świetlikowska D, Skrzypczak-Jankun E. Determining whether curcumin degradation/condensation is actually bioactivation (Review). *Int J Mol Med.* 2016; 37(5):1151-8.
60. Lin JK. Molecular targets of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595:227-43.
61. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008;132:344–62.
62. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin(diferuloylmethane). *J Biol Chem* 1995; 270:24995–5000.
63. Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of in-flammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res.* 1999; 39: 41-47
64. 4, Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res.* 2001; 480-481: 243-268.
65. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Lett.* 2008; 267: 133-164.

CAPÍTULO II

Artigo: “CURCUMINA PROMOVE EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO NO ÍLEO, FÍGADO, PULMÃO E RIM DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL”

Curcumina promove efeito antioxidante e anti-inflamatório no íleo, fígado, pulmão e rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal

Curcumin promotes antioxidant and anti-inflammatory effect in ileum, liver, lung and kidney of rats submitted to intestinal ischemia and reperfusion

Elouisa Bringhenti, Stephanie Carvalho Borges, Camila Quaglio Neves, Nilza Cristina Buttow

Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Correspondência: e-mail: ncbuttow@uem.br Tel.: +55-44-3011-4705

Resumo

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi investigar a ação da curcumina sobre o estresse oxidativo e processo inflamatório presente no íleo, fígado, pulmão e rim e sobre as alterações neuronais no plexo mientérico de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal.

Métodos: 30 ratos *Wistar* foram divididos em 5 grupos, controle (C), *sham* controle (SC), *sham* tratado (ST), isquêmico controle (IC) e isquêmico tratado (IT).. A artéria mesentérica superior foi ocluída por 45 minutos para o estabelecimento da isquemia, e o tempo de reperfusão foi de 72 horas. Os animais foram tratados via oral com 40 mg/kg de peso corporal de curcumina 30 minutos antes da cirurgia e diariamente durante o tempo de reperfusão. Foi realizada a análise das atividades enzimáticas da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST), mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-glicosaminidase (NAG) e os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e glutathione reduzida (GSH) no íleo, fígado, pulmão e rim e os níveis de nitrito no íleo, além da análise quantitativa e morfométrica dos neurônios nitrérgicos (nNOS⁺) do plexo mientérico.

Resultados: Foi observada a ocorrência de estresse oxidativo e inflamação nos órgãos estudados e alterações na densidade e no perfil neuronal de nNOS⁺. A curcumina preveniu as alterações da maioria dos parâmetros alterados após a IR intestinal.

Conclusão: A isquemia intestinal de 45 minutos seguida de reperfusão de 72 horas promove estresse oxidativo e inflamação no íleo, fígado, pulmão e rim de ratos *Wistar*. A curcumina

apresenta ação protetora em vários parâmetros analisados demonstrando atividade antioxidante e anti-inflamatória.

Palavras-chave: Neurônios nitrérgicos, Estresse oxidativo, Inflamação.

Abstract

Aim: The objective of this work was to investigate the action of curcumin on the oxidative stress and inflammatory process present in the ileum, liver, lung and kidney and on the neuronal changes in the myenteric plexus of Wistar rats submitted to intestinal ischemia and reperfusion.

Main methods: 30 Wistar rats were divided into 5 groups, control (C), sham control (SC), treated sham (ST), ischemic control (CI) and treated ischemic (IT). The superior mesenteric artery was occluded for 45 minutes for the establishment of ischemia, and the reperfusion duration was 72 hours. Animals were treated orally with 40 mg/kg body weight of curcumin 30 minutes prior to surgery and daily during the reperfusion period. Enzymatic activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione-s-transferase (GST), myeloperoxidase (MPO), n-acetyl-glycosaminidase (NAG) were evaluated, and lipid hydroperoxide (LOOH) and glutathione reduced (GSH) levels present in the ileum, liver, lung and kidney and nitrite levels in the ileum were also analysed. In addition, the quantitative and morphological analysis of the nitrergic neurons (nNOS+) was performed in the myenteric plexus.

Key findings: It was observed the occurrence of oxidative stress and inflammation in the organs and changes in the density and neuronal profile of nNOS+. Curcumin prevented alterations in most of the altered parameters after intestinal IR.

Significance: The 45-minute intestinal ischemia followed by 72-hour reperfusion promotes oxidative stress and inflammation in the ileum, liver, kidney, and lung of Wistar rats. Curcumin has protective action in several analyzed parameters demonstrating antioxidant and anti-inflammatory activity.

Keywords: Nitrergic neurons, Oxidative stress, Inflammation.

1. Introdução

A isquemia intestinal é caracterizada pela diminuição ou suspensão da irrigação sanguínea do órgão em decorrência de traumas e/ou processos patológicos, tais como embolia mesentérica, trombose, hérnia, choques hemorrágicos e hipovolêmicos, infecções, angina

abdominal e o transplante do intestino delgado ^[1]. A isquemia ocasiona um desequilíbrio metabólico no tecido, que leva à lesão tecidual. Entretanto, é no momento em que o fluxo sanguíneo é reestabelecido (reperfusão) que essas lesões se agravam ^[2].

As consequências da isquemia/reperfusão (IR) intestinal incluem a produção acentuada de espécies reativas de oxigênio (EROs), sobretudo pela ação da enzima xantina oxidase, que transforma produtos do metabolismo em radicais livres, gerando estresse oxidativo no tecido e sobrecarregando os sistemas antioxidantes endógenos ^[3]. A IR intestinal provoca ainda perda neuronal e alterações morfológicas de neurônios do plexo mientérico, que afeta funções essenciais do trato gastrointestinal, incluindo a motilidade ^[4]. Além disso, a IR ocasiona a infiltração e ativação de células do sistema imune, como neutrófilos e macrófagos e a produção de óxido nítrico no intestino, que caracterizam a ocorrência de processo inflamatório no tecido intestinal ^[5]. Durante a isquemia ocorre a perturbação da barreira epitelial intestinal, condição que promove a liberação de produtos bacterianos presentes no intestino para a corrente sanguínea. Neste momento o sistema imune é ativado, provocando uma inflamação sistêmica que pode resultar em falência múltipla de órgãos, tais como o pulmão, fígado e rim ^[6].

O organismo possui sistemas naturais de eliminação de radicais livres, que são na maioria enzimas antioxidantes e substâncias redutoras. Através da determinação da atividade enzimática e dos níveis dos produtos intermediários das reações oxidativas e inflamatórias é possível avaliar a ocorrência de estresse oxidativo e processo inflamatório no tecido ^[7]. Diante do grave quadro ocasionado pela IR a identificação de substâncias que podem ser administradas como adjuvantes na terapia após a IR intestinal é clinicamente importante. A curcumina, um composto fenólico que possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, é uma substância natural com potencial para conter os danos após o quadro isquêmico ^[8]. As propriedades apresentadas pela curcumina são resultantes da sua interação com diversos alvos moleculares, incluindo fatores de transcrição, fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e outras. A curcumina pode ligar-se diretamente e modular a atividade destes alvos ou pode regular indiretamente suas funções ^[9]. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da curcumina no íleo, fígado, pulmão e rim após o quadro de IR intestinal, através da análise de enzimas e substâncias intermediárias que participam do processo oxidativo e inflamatório.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais e protocolo experimental

No experimento foram utilizados 30 ratos machos albinos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)*; $264 \pm 3,708\text{g}$). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas durante o período de tratamento, em temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h) controladas. Todos os animais receberam ração padronizada para roedores NUVILAB[®] (recomendada pelo National Research Council & National Health Institute - USA) e água *ad libitum*. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA nº 8219300317).

O tratamento com curcumina foi iniciado 30 minutos antes da cirurgia de indução da isquemia e prosseguiu por 72 horas (período de reperfusão), uma vez por dia, sendo a última dose administrada 2 horas antes da eutanásia. Os animais foram distribuídos em 5 grupos ($n=6/\text{grupo}$), conforme tabela 1, e tratados via gavagem com 40 mg/kg de peso corporal do animal de curcumina (*Curcuma longa*; Sigma Aldrich Corp., Darmstadt, Alemanha), diluída em óleo de milho (veículo).

2.2 Indução da isquemia

Os animais foram mantidos em jejum por 15 horas antes da cirurgia. Após serem anestesiados com 20mg/kg de xilazina (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínia, SP, Brasil) e 100mg/kg de ketamina (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínia, SP, Brasil), via intramuscular, os animais de todos os grupos, com exceção do grupo controle, foram submetidos a laparotomia abdominal.

A isquemia intestinal foi estabelecida através da oclusão da artéria mesentérica superior (AMS) na porção terminal do íleo por 45 minutos utilizando um *clamp* microvascular. Amarrações laterais foram feitas como o propósito de bloquear o fluxo sanguíneo entre as regiões isquêmicas e não-isquêmicas. Após 45 minutos o *clamp* e as linhas foram removidos, restabelecendo o fluxo sanguíneo. O abdômen foi suturado com fio de nylon 3-0. Durante o período de reperfusão de 72 horas, os animais permaneceram em gaiolas individuais e receberam ração e água *ad libitum*.

2.3 Coleta dos órgãos

Após a eutanásia do animal, realizada com dose letal de 120 mg/kg de peso corporal de Tiopental Sódico (Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, SP, Brasil) por via intraperitoneal, o segmento intestinal (íleo) delimitado durante a cirurgia foi coletado e fracionado em 3 partes para as técnicas de imunofluorescência, determinação dos marcadores

biológicos envolvidos no estresse oxidativo e processo inflamatório. Fígado, pulmão e rim foram coletados para a realização das técnicas de estresse oxidativo e análise inflamatória.

2.4 Análises bioquímicas

2.4.1 Níveis de glutathiona reduzida e hidroperóxidos lipídicos

As porções do íleo, fígado, pulmão e rim destinadas à análise inflamatória e de estresse oxidativo foram mantidas em freezer -80°C após a coleta. As amostras foram trituradas e homogeneizadas com tampão fosfato 200 mM (pH 6,5). Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram determinados através da reação do homogenato com 5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico (DTNB) ^[10], a leitura foi feita em espectrofotômetro (412nm). Os valores obtidos foram interpolados na curva padrão de GSH e expressos em µg/mg de tecido.

Os homogenatos foram centrifugados a 9000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para mensurar o total de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) através do ensaio de oxidação de ferro II na presença de xilenol laranja ^[11]. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (560 nm). A concentração de LOOH foi determinada utilizando o coeficiente de extinção 4,3 mmolar 1.cm-1 e expressa em mmol/mg de tecido.

2.4.2 Atividade enzimática de superóxido dismutase, catalase e glutathiona s-transferase

O sobrenadante remanescente foi utilizado para determinar a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona s-transferase (GST). A atividade da SOD foi avaliada baseado na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol ^[12]. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (405nm) e os resultados expressos em U de SOD/mg de proteína. A atividade da GST foi avaliada utilizando o método desenvolvido por Warholm et al. ^[13]. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (340nm), usando o coeficiente de extinção de 9,6 mmolar 1.cm-1. Os resultados foram expressos em µmol/min/mg de proteína. A atividade da CAT foi realizada com base no método de Aebi ^[14], utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como substrato. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (240nm) e os resultados expressos em µmol/min/mg de proteína.

2.4.3 Atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-glicosaminidase (NAG)

Os precipitados obtidos após a centrifugação dos homogenatos foram ressuspensos com tampão fosfato de potássio 80 mM na presença de 0,5 % de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Após a homogeneinização, as amostras foram novamente centrifugadas a 11000 g por 20 min a 4 °C. Para a análise da atividade da mieloperoxidase, a reação ocorreu após a adição

de tetrametilbenzidina (TMB) ao sobrenadante. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro (620 nm) e os resultados expressos em unidade de densidade óptica (D.O)/mg de proteína/3 minutos. A análise da n-acetil-glicosaminidase foi realizada em microplaca, adicionando a amostra, tampão citrato 50mM pH 4,5 e solução de n-acetil-glicosaminidase 2,24mM. Após incubação, a reação foi parada com tampão glicina 200mM pH 10,4. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (405nm) e os resultados expressos em unidade de densidade óptica (D.O)/mg de proteína/minuto.

2.4.4 *Quantificação de nitrito*

A quantificação do óxido nítrico foi realizada utilizando a reação de Griess ^[15], na qual é quantificado o subproduto nitrito. O íleo foi homogeneizado em PBS 0,1M (pH 7,4) e centrifugado a 3000 g por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado o reagente de Griess (ácido fosfórico, sulfanilamida e N-1-naphitiletienodiamida). A mistura (50 µL dos sobrenadantes e 50 µL da solução de Griess) foi adicionada em placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (570 nm). A curva padrão foi feita utilizando diluições de NaNO₂ de 100 mM a 1.56 mM. Os níveis de nitrito foram expressos em µM.

2.5 *Análise imunohistoquímica*

A porção de íleo coletada para a técnica de imunofluorescência foi lavada com Tampão Fosfato de Sódio (PBS 0,1M, pH 7,4) e fixada com solução de paraformaldeído 4% por 3 horas. Após esse período, foi lavado duas vezes em PBS e armazenado em PBS com azida sódica (0,08%). O segmento foi dissecado com o auxílio de pinças sob estereomicroscópio para a exposição do plexo mientérico através da obtenção dos preparados totais da túnica muscular.

2.5.1 *Estudo dos neurônios mientéricos nNOS⁺*

Os preparados totais da túnica muscular do íleo de cada animal foram submetidos às técnicas imunohistoquímicas para a marcação de neurônios nitrérgicos (nNOS⁺). Foram realizadas três lavagens de 5 minutos em cada preparado total, utilizando solução de PBS (0,1M, pH 7,4) e Triton-X100 a 0,5% (PBS-T), e incubados por 1 hora em solução de bloqueio (albumina de soro bovino, BSA a 2% e soro de burro a 10% em PBS-T). Em seguida, foi realizada a marcação com o anticorpo primário anti-nNOS (1:400, rabbit, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, EUA), durante 48 horas à temperatura ambiente sob agitação, em meio de incubação composto por PBS-T, BSA a 2% e soro de burro a 2%. Após o período de incubação com o anticorpo primário, os preparados totais foram lavados cinco vezes em PBS-T por 5 minutos cada e foram incubados com o anticorpo secundário anti-rabbit (1:500 Alexa

Fluor 568, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, EUA), durante 2 horas ao abrigo da luz, em meio de incubação contendo PBS-T, BSA 2% e soro de burro 2%. As membranas foram lavadas 5 vezes em PBS-T por 5 minutos e montadas em lâminas histológicas contendo Antifade® (Life Technologies do Brasil Com. Ind. Prod. Biotec. Ltda, SP, Brasil), e armazenadas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

2.5.2 Análise quantitativa dos neurônios mientéricos imunorreativos

Imagens aleatórias das lâminas dos preparados totais foram capturadas por câmera de alta resolução acoplada ao microscópio de fluorescência FSX100 (Olympus). As imagens foram analisadas no programa Image-Pro Plus (v. 4.5.029; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Para a quantificação foram contados todos os neurônios presentes em 30 imagens capturadas em objetiva de 20X. A área de cada imagem foi de aproximadamente 0,144 mm² e a área total quantificada foi 4,32 mm². Os resultados foram expressos como neurônios/cm².

2.5.3 Análise morfométrica dos neurônios imunorreativos

A análise morfométrica da população nitrérgica (nNOS⁺) no plexo mientérico foi realizada através das imagens aleatórias capturadas em objetiva de 20x e analisadas no software Image Pro-Plus. Foram mensuradas a área de 100 corpos celulares por animal. Os resultados morfométricos foram expressos em μm².

2.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada no programa Graphpad Prism 5. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. Para a comparação entre os grupos com distribuição normal de dados foi aplicada a análise de variância One-way (ANOVA), seguida do pós-teste de *Tukey*. Para dados com distribuição não normal o teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* foi utilizado, seguido do pós-teste de *Dunns*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1 Íleo

3.1.1 Análises bioquímicas

Os níveis de GSH diminuíram no grupo IC em relação ao grupo C ($p < 0,01$) e aumentaram no grupo IT em comparação com o grupo IC ($p < 0,01$) (Fig. 1A). Os níveis de LOOH aumentaram no grupo IC em comparação com o grupo C ($p < 0,05$) e ocorreu uma redução no grupo IT quando comparado com o grupo IC ($p < 0,05$) (Fig. 1B). Ocorreu um

aumento na atividade da SOD no grupo IC em relação aos grupos C, SC e ST ($p < 0,05$), enquanto a atividade no grupo IT diminuiu em relação ao grupo IC ($p < 0,05$) (Fig. 1C). A atividade de CAT aumentou no grupo IC em comparação com o grupo C ($p < 0,01$), e houve uma redução da atividade no grupo IT em relação ao grupo IC ($p < 0,01$) (Fig. 1D). A atividade de GST não sofreu alterações entre os grupos estudados ($p > 0,05$) (Fig. 1E).

A atividade de NAG aumentou no grupo IC quando comparada com os grupos C e ST ($p < 0,05$) e ocorreu uma redução da atividade no grupo IT quando relacionado com o grupo IC ($p < 0,05$) (Fig. 1F). A atividade da MPO aumentou no grupo IC em relação aos grupos C e SC ($p < 0,05$) (Fig. 1G).

3.1.2 Quantificação de Óxido nítrico

Os níveis de nitrito no íleo aumentaram no grupo IC quando comparados ao grupo C ($p < 0,01$). No grupo IT os níveis de nitrito foram menores em comparação ao grupo IC ($p < 0,01$) (Fig. 1H).

3.1.3 Análise quantitativa dos neurônios mientéricos nNOS imunorreativos

A densidade neuronal da população nitrérgica (nNOS⁺) diminuiu no grupo IC quando comparada com o grupo C ($p < 0,01$), enquanto que, este parâmetro não foi alterado significativamente no grupo IT em relação ao grupo IC ($p > 0,05$) (Fig. 2A).

3.1.4 Análise morfológica dos neurônios nNOS imunorreativos

A área do perfil celular dos neurônios nitrérgicos aumentou no grupo IC em relação aos grupos C e SC ($p < 0,05$), o grupo IT apresentou valores semelhantes ao controle (Fig. 2B).

3.2 Fígado

3.2.1 Análises Bioquímicas

Os níveis de LOOH no fígado aumentaram no grupo IC em comparação com o grupo C ($p < 0,01$). Ocorreu uma redução dos níveis de LOOH no grupo IT em relação ao grupo IC ($p < 0,01$) (Fig. 3B). A atividade da enzima CAT aumentou no grupo IC em relação ao grupo C ($p < 0,05$), enquanto no grupo IT ocorreu uma redução na sua atividade quando comparada com o grupo IC ($p < 0,05$) (Fig. 3D). A atividade da MPO aumentou no grupo C em relação aos grupos C, SC e ST ($p < 0,05$), enquanto ocorreu uma diminuição na sua atividade no grupo IT em relação ao grupo IC ($p < 0,05$) (Fig. 3G). Os níveis de GSH, bem como as atividades enzimáticas de SOD (Fig. 3C), GST (Fig. 3E) e NAG (Fig. 3F), não sofreram alterações nos grupos estudados ($p > 0,05$).

3.3 Pulmão

3.3.1 Análises Bioquímicas

A figura 4 demonstra uma diminuição nos níveis de GSH no grupo IC em comparação aos grupos C ($p < 0,05$) (Fig. 4A). Os níveis de LOOH aumentaram no grupo IC em relação aos grupos C e ST ($p < 0,05$) (Fig. 4B). A atividade das enzimas SOD e CAT no grupo IC aumentou no grupo IC quando comparado com os grupos C, SC e ST ($p < 0,01$), e ocorreu uma redução na atividade no grupo IT em comparação com o grupo IC ($p < 0,01$) (Fig. 4C e 4D). A atividade da enzima da glutathione s-transferase (GST) não foi alterada nos grupos estudados ($p > 0,05$) (Fig. 4E).

A atividade enzimática da NAG aumentou significativamente no grupo IC em comparação aos grupos C, SC e ST ($p < 0,01$) e no grupo IT em relação aos grupos C e ST ($p < 0,01$) (Fig. 4F). A atividade enzimática da MPO aumentou no grupo IC em relação aos grupos C, SC e ST ($p < 0,01$). No grupo IT ocorreu a redução da atividade de MPO em comparação com o grupo IC ($p < 0,01$) (Fig. 4G).

3.4 Rim

3.4.1 Análises Bioquímicas

Os níveis de GSH no rim diminuíram nos grupos IC e IT em relação ao grupo C ($p < 0,01$) (Fig. 5A). Os níveis de LOOH aumentaram no grupo IC e IT quando comparados com o grupo C ($p < 0,01$) (Fig. 5B). Ocorreu um aumento significativo na atividade da enzima CAT no grupo IC quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$), enquanto no grupo IT ocorreu a redução da atividade da CAT em relação ao grupo IC ($p < 0,05$) (Fig. 5D). A atividade da enzima GST aumentou no grupo IC e quando comparada com o grupo C ($p < 0,05$) (Fig. 5E).

A atividade enzimática da MPO aumentou nos grupos IC e IT em comparação com o grupo C ($p < 0,05$) (Fig. 5G). As atividades enzimáticas de SOD (Fig. 5C) e NAG (Fig. 5F) não demonstraram diferenças estatísticas significativas nos grupos estudados ($p > 0,05$)

4. Discussão

Nosso estudo demonstrou que a isquemia intestinal de 45 minutos, seguida de 72 horas de reperfusão provocou um quadro de estresse oxidativo (EO) nos diferentes órgãos estudados. Este quadro somado ao processo inflamatório, verificados em nosso estudo através da alteração dos marcadores bioquímicos avaliados, são responsáveis por danos à mucosa intestinal, lesão e morte de neurônios entéricos, que podem resultar em alterações na função absorptiva, secretora

e motora do intestino [16,17]. Além disso, a ruptura da barreira epitelial durante a IR intestinal promove a passagem de bactérias, produtos bacterianos como lipopolissacarídeos, endotoxinas e metabólitos bacterianos para a corrente sanguínea podendo promover a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), a qual causa estresse oxidativo e inflamação em outros órgãos como fígado, pulmão e rim [18]. A ruptura da barreira epitelial e a quantidade de produtos bacterianos translocados, bem como o efeito do tratamento com moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias, está diretamente relacionado com a intensidade dos danos ocasionados nos diferentes órgãos. Desta forma foi possível observar diferentes graus de estresse oxidativo e inflamação e diferentes efeitos da curcumina nos órgãos avaliados.

Nos quatro órgãos estudados encontramos alterações nos parâmetros de estresse oxidativo. Esta injúria pode ser justificada pela sequência de reações bioquímicas que ocorrem durante a IR inicialmente no intestino. Na isquemia a restrição de oxigênio afeta a fosforilação oxidativa mitocondrial reduzindo a produção de ATP. Esta redução promove alterações na concentração de Na^+ intracelular devido à falência da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+) e promove influxo de Ca^{2+} levando ao edema celular [19]. O excesso de Ca^{2+} irá ativar enzimas, as quais irão converter a xantina desidrogenase em xantina oxidase que, na presença do oxigênio durante a reperfusão, irá converter a hipoxantina em xantina [20], tendo como produto final o ácido úrico e como subproduto o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$). O ânion superóxido é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) altamente deletéria para as células [21] que pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da reação de Fenton, onde será transformado no radical hidroxila (OH^-) [20], este último poderá promover a peroxidação lipídica das membranas celulares. Nos quatro órgãos estudados houve um aumento significativo na formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), subprodutos da peroxidação lipídica. O aumento da peroxidação lipídica após a IR intestinal é relatada na literatura em órgãos como o intestino [22], fígado [23] e pulmão [24]. Apesar destes efeitos deletérios da IR nos grupos isquêmicos tratados com curcumina (IT) observamos que a peroxidação lipídica no íleo, pulmão e fígado mantiveram-se semelhantes ao controle. A atividade antioxidante da curcumina está relacionada com sua estrutura química. Ela é capaz de realizar a doação de elétrons a partir de seus anéis fenólicos [25], neutralizando as EROs e impedindo sua reação com constituintes celulares. Além disso, a curcumina também é capaz de inibir a atividade enzimática da xantina oxidase, reduzindo a produção do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) [8].

Em outros parâmetros de estresse oxidativo avaliados, observamos o aumento da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) no íleo (47%) e no pulmão

(45%), da catalase (CAT) no íleo (65%), fígado (93%), pulmão (102%) e rim (91%) e da glutathione s-transferase (GST) no rim após a IR intestinal. A restauração do fluxo sanguíneo durante a reperfusão agrava a lesão no órgão [26] através da produção acentuada de radicais livres, que sobrecarregam os mecanismos de defesa antioxidantes alterando a atividade destas enzimas [27], tais como SOD, CAT e GST. Dentre as atividades destas enzimas, a SOD transforma os radicais superóxido em H_2O_2 , enquanto a CAT faz a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio molecular [28]. A GST reduz fosfolipídios, ácidos graxos e hidroperóxidos de colesterol, produtos de vida curta derivados da peroxidação das membranas lipídicas pelas EROs, impedindo sua quebra em compostos secundários, tais como epóxidos e carbonilas reativas, que são considerados genotóxicos [29]. Além disso, a GST catalisa o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathione (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico [30]. Diversos autores relatam a alteração no comportamento de enzimas antioxidantes após a IR intestinal no intestino [31,32], fígado [33], pulmão [34] e rim [35]. Nossos estudos demonstraram que na IR intestinal a curcumina manteve as funções das enzimas SOD e CAT a valores semelhantes ao grupo controle. Estudos tem demonstrado que a curcumina possui a capacidade de modular a atividade das enzimas antioxidantes durante quadros de estresse oxidativo após a IR intestinal no fígado [36], pulmão [37] e intestino [38].

Além das enzimas antioxidantes, a glutathione reduzida (GSH), um tiol não-proteico, tem um papel chave na proteção contra o estresse oxidativo, pois ela reage com as EROs ou participa como cofator de enzimas antioxidantes [39]. Sua redução pode significar que a GSH está sendo utilizada para a proteção contra o estresse oxidativo ou que os danos oxidativos provocaram alterações no DNA prejudicando sua síntese. Em nosso estudo observamos que houve uma redução da GSH no íleo, pulmão e rim no grupo isquêmico controle. Akinrinmade et al. [32] também observaram uma diminuição nos níveis de GSH no intestino 45 minutos após a IR intestinal, enquanto Barut et al. [24] relataram uma redução nos níveis de GSH no pulmão após isquemia intestinal seguida de 3 horas de reperfusão. Em nosso estudo, o tratamento com curcumina foi capaz de manter os níveis de GSH a valores semelhantes ao controle, principalmente no íleo. Estudos demonstram que a curcumina aumenta a biossíntese da GSH, principalmente através da modulação da expressão do gene glutamato cisteína ligase (*GCLC*) [8].

A além do EO, a IR intestinal também é responsável por desencadear processos inflamatórios, tanto no íleo, quanto em outros órgãos afetados. Esta pode ser medida pela avaliação da atividade de duas enzimas, a mieloperoxidase (MPO) e a n-acetil-glicosaminidase (NAG). A atividade enzimática da MPO é capaz de avaliar o acúmulo de neutrófilos ativos no

tecido, e é frequentemente utilizada como marcador de processo inflamatório ^[40]. É uma enzima presente majoritariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, que catalisa a reação do peróxido de hidrogênio com cloreto, formando radicais livres e substâncias oxidantes com ação antimicrobiana, entretanto, essas substâncias também contribuem para o aumento do estresse oxidativo e lesão tecidual ^[41]. A n-acetil-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossomal produzida principalmente pelos macrófagos, e sua atividade pode ser empregada como meio de avaliação indireta da ativação de macrófagos ^[42]. Neste trabalho observamos um aumento da atividade de MPO no íleo (54%), pulmão (140%), fígado (43%) e rim (198%). Já a NAG aumentou significativamente somente no íleo (49%) e pulmão (74%). O que poderia justificar estes aumentos nos parâmetros inflamatórios é a perda da integridade da barreira epitelial intestinal tendo em vista que estudos demonstram que a isquemia mesentérica de 45 minutos está relacionada com o aumento da permeabilidade intestinal ^[43], condição associada à diminuição da atividade da adenilato ciclase e dos níveis de AMPc nos enterócitos ^[44]. O AMPc é responsável por regular positivamente as junções comunicantes (GAP) entre as células, portanto a diminuição da sua concentração promove um desequilíbrio na permeabilidade da barreira epitelial ^[45]. O aumento da permeabilidade intestinal promove a translocação de produtos bacterianos para a circulação sanguínea. Estas substâncias interagem com os receptores de membrana das células imunes, resultando em uma cascata de sinalização que ativa fatores de transcrição, como o NF- κ B, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas e quimiocinas ^[46]. Estas substâncias ativam e recrutam células da imunidade inata e adaptativa, como neutrófilos e macrófagos para o tecido lesado ^[347], produzindo uma resposta inflamatória que intensifica a lesão tecidual. Apesar destes efeitos sobre a inflamação, no grupo isquêmico o tratamento com curcumina foi capaz de manter a atividade da MPO semelhante ao grupo controle em todos os órgãos alterados. Enquanto a NAG que havia aumentado somente no pulmão e íleo, manteve sua atividade apenas no íleo. Esta melhora ocasionada pela curcumina deve-se a sua capacidade de reduzir a infiltração de células imunes, entre elas neutrófilos e macrófagos, nos tecidos em condições inflamatórias ^[48], pois ela inibe a transcrição do NF- κ B ^[8].

Outro mediador inflamatório importante é o óxido nítrico (NO), mensurado em nosso estudo apenas no íleo. Para essa avaliação utilizamos um método indireto através da dosagem do nitrito ^[15]. Observamos no grupo isquêmico um aumento considerável dos níveis de nitrito (300%). O NO é produzido por três diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) ^[49]. Entretanto, a lesão por IR intestinal

têm sido associada principalmente ao aumento da produção de NO induzível, através da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), responsável pela indução da transcrição de iNOS^[50], por mediadores inflamatórios. O NO produzido pela ativação de iNOS possui ação citotóxica, que resulta da sua ação direta sobre os constituintes celulares ou da sua reação com compostos liberados durante o processo inflamatório, no qual células ativadas, como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e enzimas que produzem espécies reativas de oxigênio, como a MPO e a NAG. O superóxido produzido pela MPO interage com o NO formando o peroxinitrito (ONOO⁻), um radical associado à oxidação de proteínas e morte celular^[51]. Em nosso estudo, a curcumina preveniu o aumento da produção de óxido nítrico no íleo, provavelmente em decorrência da sua capacidade de inibir o NF-κB, impedindo a ativação da iNOS^[8].

Os processos inflamatórios e o quadro de estresse oxidativo que encontramos podem justificar a neurodegeneração que ocorre no sistema nervoso entérico do íleo. A IR intestinal, portanto, é capaz de promover alterações morfofuncionais no intestino, como alteração na motilidade, secreção e absorção. Em nosso estudo observamos uma redução na densidade e alterações morfológicas nos neurônios nitrérgicos (nNOS⁺) do plexo mientérico do íleo após 72 horas de reperfusão. Rivera et al.^[52] também observou diminuição da densidade e aumento no perfil neuronal de nNOS⁺ após 24 horas de reperfusão, sendo que as alterações persistiram após 4 dias de reperfusão. Estes resultados podem ser justificados pelo quadro de estresse oxidativo e inflamatório observados no íleo. No entanto, estas alterações foram amenizadas no grupo isquêmico tratado com curcumina, onde observamos que estes animais apresentaram-se semelhantes ao grupo controle. Provavelmente por sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo e a inflamação^[8].

As diferenças que observamos nos órgãos estudados é ocasionada por suas particularidades. A lesão hepática após a IR intestinal é uma situação frequente, principalmente pelo fato de os dois órgãos possuírem uma via anatômica comum, a veia porta, por onde as substâncias absorvidas pelo intestino são transportadas para serem metabolizadas pelo fígado. Em consequência disso, a oclusão da artéria mesentérica reduz o fluxo sanguíneo no fígado, produzindo alterações metabólicas importantes^[53]. Entretanto, o fígado possui uma capacidade de reserva metabólica substancial que faz com que as alterações presentes neste órgão não sejam detectadas a princípio, explicando o motivo pelo qual o fígado foi o órgão afetado em menor grau em nosso estudo. Além disso, estudos demonstram que a infiltração de neutrófilos é determinante para a lesão tecidual hepática^[54], situação observada em nosso estudo através do

aumento da enzima MPO. Da mesma forma, é possível haver o envolvimento de outras células, como macrófagos ^[55]. No entanto, não encontramos alteração na atividade da enzima NAG neste órgão e neste tempo de reperfusão. Quando avaliamos o pulmão, observamos alterações mais significativas devido a IR intestinal. Neste órgão é comum o desenvolvimento de insuficiência respiratória após a isquemia, pois este é um dos órgãos mais suscetíveis à resposta inflamatória sistêmica por ser altamente vascularizado. É reconhecido que a IR intestinal promove lesão pulmonar, sobretudo pelo aumento da infiltração de neutrófilos e ativação de macrófagos alveolares ^[56]. O aumento significativo da atividade das enzimas MPO e NAG observada no pulmão em nosso trabalho confirmam esta teoria. Entretanto, essas enzimas produzem espécies reativas de oxigênio, que contribuem para o aumento do estresse oxidativo no órgão, também visualizado em nosso estudo. As análises de rim demonstraram que este órgão também é sensível a IR intestinal, no entanto, em menor grau que o pulmão. A disfunção renal também é atribuída à IR intestinal por diversos autores ^[57,58], percebida através da alteração de marcadores de estresse oxidativo e inflamatórios, além de alterações morfológicas presentes nos túbulos renais. Entretanto, ainda são pouco elucidados os mecanismos pelos quais a lesão renal é estabelecida ^[59].

Constatamos que, da mesma maneira em que cada órgão responde diferentemente à IR intestinal, devido à particularidade de cada tecido, que envolvem o metabolismo celular, o aporte de circulação colateral e fatores humorais locais, a resposta ao tratamento com curcumina também foi diferente entre os órgãos estudados. No íleo, fígado e pulmão obtivemos uma ação antioxidante e anti-inflamatória mais evidente da curcumina, entretanto no rim sua atividade foi bastante discreta. Isto deve-se ao fato de que a distribuição tecidual da curcumina varia conforme o órgão. A curcumina é metabolizada no intestino e no fígado, portanto suas maiores concentrações estão presentes nestes órgãos ^[60]. Marczylo et al. ^[61] dosaram a concentração de curcumina nos órgãos utilizando cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) após a administração oral (340mg/kg) e concluíram que as maiores concentrações são encontradas no plasma (16,1 ng/mL), urina (2,0 ng/mL), mucosa intestinal (1,4 mg/g), fígado (3671.8 ng/g), e por último no rim (206,8 ng/g) e no coração (807,6 ng/g). Através do estudo de Marczylo et al ^[61] é possível perceber que as concentrações de curcumina presentes no rim são menores em comparação com o intestino e fígado, esclarecendo o motivo pelo qual, em nosso estudo, a curcumina não teve uma ação muito relevante sobre este órgão. Além disso, o fato da curcumina possuir, em sua forma livre, baixa biodisponibilidade quando administrada via oral foi um fator limitante para este estudo. Uma alternativa neste caso seria a utilização de formas

farmacêuticas, como nanocápsulas ou nanopartículas contendo curcumina, que possuem liberação controlada, melhorando sua absorção pelo organismo e seus efeitos terapêuticos [62].

5. Conclusão

Em resumo, a isquemia intestinal de 45 minutos, seguida de 72 horas de reperfusão ocasiona estresse oxidativo e inflamação no íleo, fígado, pulmão e rim, caracterizados pela alteração dos parâmetros oxidativos e inflamatórios avaliados. A isquemia e reperfusão ainda ocasiona perda neuronal e alterações morfológicas de neurônios nitrérgicos do plexo mientérico. A curcumina, na dose utilizada (40mg/kg), demonstra atividade antioxidante e anti-inflamatória, prevenindo a alteração de diversos parâmetros nos diferentes órgãos. Foi possível perceber também que cada órgão responde de uma forma diferente à IR intestinal e ao tratamento. O íleo, pulmão e rim foram afetados em maior grau do que o fígado. E o efeito antioxidante e anti-inflamatório da curcumina foi mais eficiente no íleo, pulmão e fígado. A resposta à ação protetora da curcumina também varia conforme o órgão, principalmente em decorrência da sua distribuição tecidual.

Conflito de interesses

Os autores não possuem conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF) da Universidade Estadual de Maringá, ao Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] Mallick IH1, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*. 2004; 49(9):1359-1377.
- [2] Stallion A, Kou TD, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, Levine AD. IL-10 is not protective in intestinal ischemia reperfusion injury. *J Surg Res*. 2002; 105(2):145–152.
- [3] McCord, J.M.: Oxygen-derived free radicals in postischaemic tissue injury. *N. Engl. J. Med*. 1985; 312:159–163.
- [4] Hakgüder G, Akgür FM, Ateş O, Olguner M, Aktuğ T, Ozer E. Short-term intestinal ischemia-reperfusion alters intestinal motility that can be preserved by xanthine oxidase inhibition. *Dig Dis Sci*. 2002; 47(6):1279-83.

- [5] Paterno F, Longo WE. The etiology and pathogenesis of vascular disorders of the intestine. *Radiol Clin North Am.* 2008; 46(5):877-85.
- [6] Vinardi S, Pierro A, Parkinson EJ, Vejchapipat P, Stefanutti G, Spitz L, Eaton S. Hypothermia throughout intestinal ischaemia-reperfusion injury attenuates lung neutrophil infiltration. *J Pediatr Surg.* 2003; 38:88-91.
- [7] Mayes PA. Biologic oxidation. *Harper's biochemistry.* 1990; 105-11.
- [8] Lin JK. Molecular targets of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595:227-43.
- [9] Agrawal DK, Mishra PK. Curcumin and its analogues: potential anticancer agents. *Med Res Rev.* 2010; 30(5):818-60.
- [10] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *Analytical Biochemistry,* 1968; 25:192-205.
- [11] Jiang Z, Woollard ACS, Wolff S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an Iodometric Method. *Lipids,* 1991; 26: 853-856.
- [12] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry,* 1974. 47: 469-474.
- [13] Warholm M, Guthenberg C, von Bahr C, Mannervik B. Glutathione transferases from human liver. *Methods Enzymol.* 1985; 113:499-504.
- [14] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol,* 1984; 105: 121-126.
- [15] P. Griess, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 12 (1879) 426.
- [16] Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Ann Rev Physiol.* 1995; 57:311-332.
- [17] Matthijsen RA, Derikx JP, Kuipers D, van Dam RM, Dejong CH, Buurman WA. Enterocyte shedding and epithelial lining repair following ischemia of the human small intestine attenuate inflammation. *PLoS One.* 2009; 15;4(9):7045.
- [18] Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir. Bras.* 2005; 20(4):336-343.
- [19] Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age (Omaha)* 1997; 20:127-140.
- [20] Lee MC, Velayutham M, Komatsu T, Hille R, Zweier JL. Measurement and Characterization of Superoxide Generation from Xanthine Dehydrogenase: A Redox-Regulated Pathway of Radical Generation in Ischemic Tissues. *Biochemistry* 2014; 53:6615-6623.

- [21] Thomas CE, Morehouse LA, Aust SD. Ferritin and superoxide dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1985; 260: 3275-80.
- [22] Turan I, Ozacmak HS, Ozacmak VH, Barut F, Araslı M. Agmatine attenuates intestinal ischemia and reperfusion injury by reducing oxidative stress and inflammatory reaction in rats. *Life Sci.* 2017; 15;189:23-28.
- [23] Saidi SA, Ncir M, Chaaben R, Jamoussi K, van Pelt J, Elfeki A. Liver injury following small intestinal ischemia reperfusion in rats is attenuated by Pistacia lentiscus oil: antioxidant and anti-inflammatory effects. *Arch Physiol Biochem.* 2017; 123(4):199-205.
- [24] Barut F, Ozacmak VH, Turan I, Sayan-Ozacmak H, Aktunc E. Reduction of Acute Lung Injury by Administration of Spironolactone After Intestinal Ischemia and Reperfusion in Rats. *Clin Invest Med.* 2016; 1;39(1):15-24.
- [25] Jankun J, Wyganowska-Świątkowska M, Dettlaff K, Jelińska A, Surdacka A, Wątróbska-Świetlikowska D, Skrzypczak-Jankun E. Determining whether curcumin degradation/condensation is actually bioactivation (Review). *Int J Mol Med.* 2016; 37(5):1151-8.
- [26] Parks DA, Granger DN. Ischemia-reperfusion injury: a radical view. *Hepatology.* 1988; 8(3):680-2.
- [27] Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(11):1287-312.
- [28] Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J Med.* 2017.
- [29] Hubatsch I, Ridderström M, Mannervik B. Human glutathione transferase A4-4: an Alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem. J.* 1998; 330:175–79.
- [30] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45:51-88.
- [31] Demir M, Amanvermez R, Kamalı Polat A, Karabıçak I, Cınar H, Kesicioğlu T, Polat C. The effect of silymarin on mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Med Princ Pract.* 2014; 23(2):140-4.
- [32] Akinrinmade JF, Akinrinde SA, Odejobi A, Oyagbemi AA. Evidence of attenuation of intestinal ischemia-reperfusion injury following pre-treatment with methanolic extracts from *Chromola odorata* in rats. *J Complement Integr Med.* 2015; 12(1):23-32.

- [33] Fan Z, Jing H, Yao J, et al. The protective effects of curcumin on experimental acute liver lesion induced by intestinal ischemia-reperfusion through inhibiting the pathway of NF- κ B in a rat model. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:191624.
- [34] Guzel A, Kanter M, Guzel A, Yucel AF, Erboğa M. Protective effect of curcumin on acute lung injury induced by intestinal ischaemia/reperfusion. *Toxicol Ind Health*. 2013; 29(7):633-42.
- [36] Kiliç K, Hancı V, Selek S, Sözmen M, Kiliç N, Cıtil M, Yurtlu DA, Yurtlu BS. The effects of dexmedetomidine on mesenteric arterial occlusion-associated gut ischemia and reperfusion-induced gut and kidney injury in rabbits. *J Surg Res*. 2012; 178(1):223-32.
- [37] Fan Z, Jing H, Yao J, et al. The protective effects of curcumin on experimental acute liver lesion induced by intestinal ischemia-reperfusion through inhibiting the pathway of NF- κ B in a rat model. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:191624.
- [38] Guzel A, Kanter M, Guzel A, Yucel AF, Erboğa M. Protective effect of curcumin on acute lung injury induced by intestinal ischaemia/reperfusion. *Toxicol Ind Health*. 2013; 29(7):633-42.
- [39] Onder A, Kapan M, Gümüş M, Yüksel H, Büyük A, Alp H, Başarılı MK, Fırat U. The protective effects of curcumin on intestine and remote organs against mesenteric ischemia/reperfusion injury. *Turk J Gastroenterol*. 2012; 23(2):141-7.
- [40] Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol*. 2002; 348:93-112.
- [41] Faith M, Sukumaran A, Pulimood AB, Jacob M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? *Clin Chim Acta*. 2008; 396(1-2):23-5.
- [42] Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018; 15(640):47-52.
- [43] Lamaita RM, Pontes A, Belo AV, Caetano JP, Andrade SP, Cândido EB, Carneiro MM, Silva-Filho AL. Evaluation of N-acetylglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. *J Obstet Gynaecol Res*. 2012; 38(5):810-6.
- [44] Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JP, Matthijsen RA, de Bruïne AP, van Bijnen AA, van Dam RM, Dejong CH, Buurman WA. Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. *Am J Pathol*. 2010; 176(5):2283-91.

- [45] Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, Brett J, Morrow B, Morris SA, Bilezikian JP, Silverstein SC, Stern D. Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am J Physiol.* 1992; 262(3 Pt 1):546-54.
- [46] Burghardt RC, Barhoumi R, Sewall TC, Bowen JA. Cyclic AMP Induces Rapid Increases in Gap Junction Permeability and Changes in the Cellular Distribution of Connexin43. *J. Membrane Biol.* 1995; 48:243-253.
- [47] Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* 2011; 17(7):796-808.
- [48] Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(12):826-37.
- [49] Ukil A, Maity S, Karmakar S, Datta N, Vedasiromoni JR, Das PK. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Br J Pharmacol.* 2003; 139(2):209-18.
- [50] Cuzzocrea S, Chatterjee P, Mazzon E, Dugo L, De Sarro A, Van de Loo FAJ, Caputi AP, Thiemermann C. Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after posts ischemic injury. *Shock.* 2002; 18:169-76.
- [51] Montalto MC, Hart ML, Jordan JE, Wada K, Stahl GL. Role for complement in mediating intestinal nitric oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression. *Am J Physiol.* 2003; 285:G197-206.
- [52] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271(5):1424-37.
- [53] Rivera LR, Thacker M, Castelucci P, Bron R, Furness JB. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea pig enteric nervous system. *Acta Neuropathol.* 2009; 118: 261-270.
- [54] Horie Y, Wolf R, Miyasaka M, Anderson DC, Granger DN. Leukocyte adhesion and hepatic microvascular responses to intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Gastroenterology.* 1996; 111(3):666-73.
- [55] Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Bensard DD, Anderson BO, Banerjee A. Liver injury is a reversible neutrophil-mediated event following gut ischemia. *Arch. Surg.* 1992; 127: 175-179.
- [56] Clark EV, Lee RF, White ZL, Jonak GZ, Feuerstein FC. Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue, *Brain Res. Bull.* 1994; 35:387-392.

- [57] Börjesson A, Wang X., Sun Z, Wallén R, Deng X, Johansson E, Andersson R. Effects of n-acetylcysteine on pulmonary macrophage activity after intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Dig Surg* 2000; 17:379–389.
- [58] Ahmed MF, Azza SA, Mona ME, Sanaa Akenawy. Mostafa E. El-Sayed cBeneficial effects of thymoquinone and omega-3 on intestinal ischemia/reperfusion-induced renal dysfunction in rats *Bulletin of Faculty of Pharmacy*. 2014; 52:171–177.
- [59] Aldemir D, Tufan H, Tecder-Unal M, Türkoğlu S, Oğüs E, Kayhan Z, Haberal M. Age-related alterations of oxidative stress and arginase activity as a response to intestinal ischemia-reperfusion in rat kidney and liver. *Transplant Proc*. 2003; 35(7):2811-5.
- [60] Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*. 1998; 64(4):353-6.
- [61] Marczylo T, Steward WP, Gescher, AJ. Rapid Analysis of Curcumin and Curcumin Metabolites in Rat Biomatrices Using a Novel Ultraperformance Liquid Chromatography (UPLC) Method. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009; 57: 797-803.
- [62] Xu Y, Hu N, Jiang W, Yuan HF, Zheng DH. Curcumin-carrying nanoparticles prevent ischemia-reperfusion injury in human renal cells. *Oncotarget*. 2016; 7(52):87390-87401.

Figura 1. Parâmetros bioquímicos do fígado. Níveis de glutatona reduzida (GSH) (A), níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (B), atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (C), atividade enzimática da catalase (CAT) (D), atividade enzimática da glutatona s-transferase (GST) (E), atividade enzimática da n-acetil-glicosaminidase (NAG) (F) e atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) (G), níveis de nitrito (H). ^aSignificativamente diferente do grupo Controle (C). ^bSignificativamente diferente do grupo *Sham* controle (SC). ^cSignificativamente diferente do grupo *Sham* tratado (ST). ^dSignificativamente diferente do grupo Isquêmico controle (IC). Os resultados representam a média ± erro padrão ($n=6$).

Figura 2. (A) Densidade neuronal de nNOS⁺. (B) Média da área celular dos neurônios nNOS⁺. ^aSignificativamente diferente do grupo Controle (C). ^bSignificativamente diferente do grupo *Sham* controle (SC). Os resultados representam a média ± erro padrão ($n=6$).

Figura 3. Parâmetros bioquímicos do pulmão. Níveis de glutatona reduzida (GSH) (A), níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (B), atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (C), atividade enzimática da catalase (CAT) (D), atividade enzimática da glutatona s-transferase (GST) (E), atividade enzimática da n-acetil-glicosaminidase (NAG) (F) e atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) (G). ^aSignificativamente diferente do grupo Controle (C). ^bSignificativamente diferente do grupo *Sham* controle (SC). ^cSignificativamente diferente do grupo *Sham* tratado (ST). ^dSignificativamente diferente do grupo Isquêmico Controle (IC). Os resultados representam a média ± erro padrão ($n=6$).

Figura 4. Parâmetros bioquímicos do pulmão. Níveis de glutatona reduzida (GSH) (A), níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (B), atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (C), atividade enzimática da catalase (CAT) (D), atividade enzimática da glutatona s-transferase (GST) (E), atividade enzimática da n-acetil-glicosaminidase (NAG) (F) e atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) (G). ^aSignificativamente diferente do grupo Controle (C). ^bSignificativamente diferente do grupo *Sham* controle (SC). ^cSignificativamente diferente do grupo *Sham* tratado ST. ^dSignificativamente diferente do grupo Isquêmico controle (IC). Os resultados representam a média ± erro padrão ($n=6$).

Figura 5. Parâmetros bioquímicos do rim. Níveis de glutatona reduzida (GSH) (A), níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (B), atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (C), atividade enzimática da catalase (CAT) (D), atividade enzimática da glutatona s-transferase (GST) (E), atividade enzimática da n-acetil-glicosaminidase (NAG) (F) e atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) (G). ^aSignificativamente diferente do grupo Controle (C). ^bSignificativamente diferente do grupo *Sham* controle (SC). ^cSignificativamente diferente do grupo *Sham* tratado (ST). ^dSignificativamente diferente do grupo Isquêmico controle (IC). Os resultados representam a média ± erro padrão ($n=6$).

Tabela 1. Grupos experimentais e tratamento.

Grupos			AMS ¹	Tratamento
C	Controle	não operado	-	veículo
SC	<i>Sham</i> controle	submetido à cirurgia	não ocluída	veículo
ST	<i>Sham</i> tratado	submetido à cirurgia	não ocluída	curcumina
IC	Isquêmico controle	submetido à cirurgia	ocluída	veículo
IT	Isquêmico tratado	submetido à cirurgia	ocluída	curcumina

¹AMS artéria mesentérica superior

Figura 1

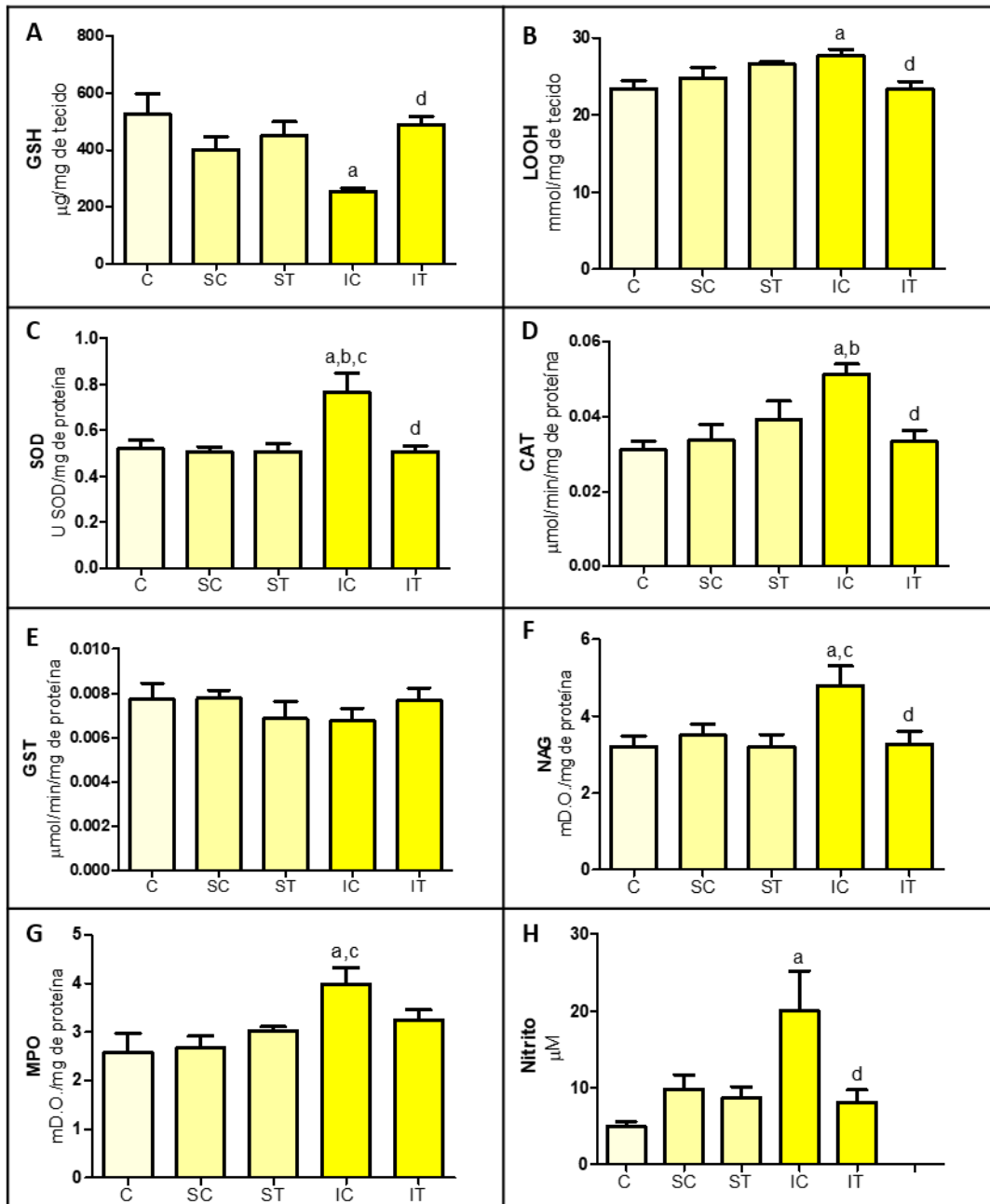


Figura 2

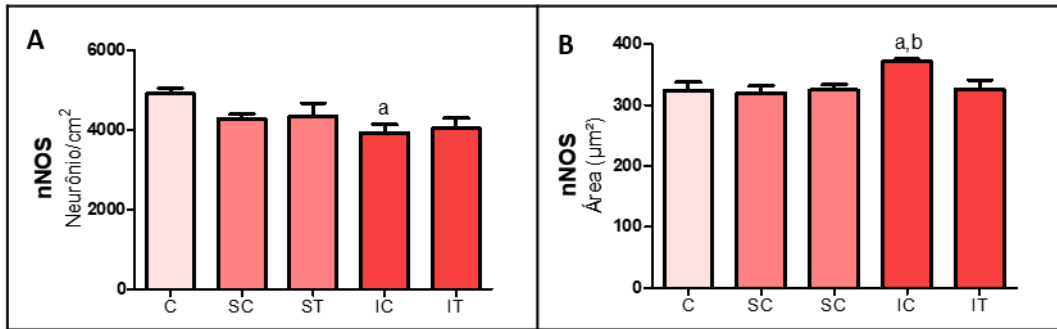


Figura 3

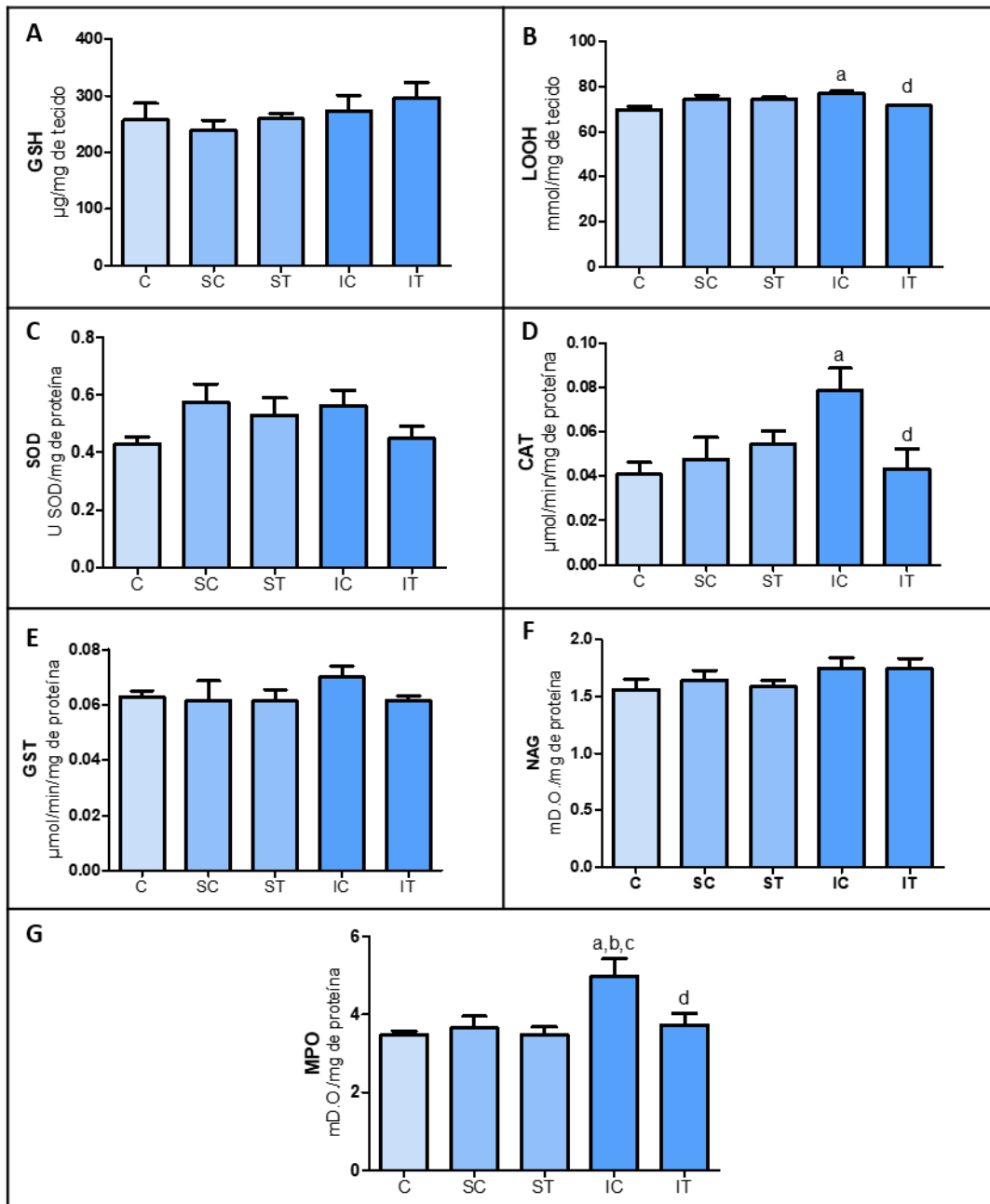


Figura 4

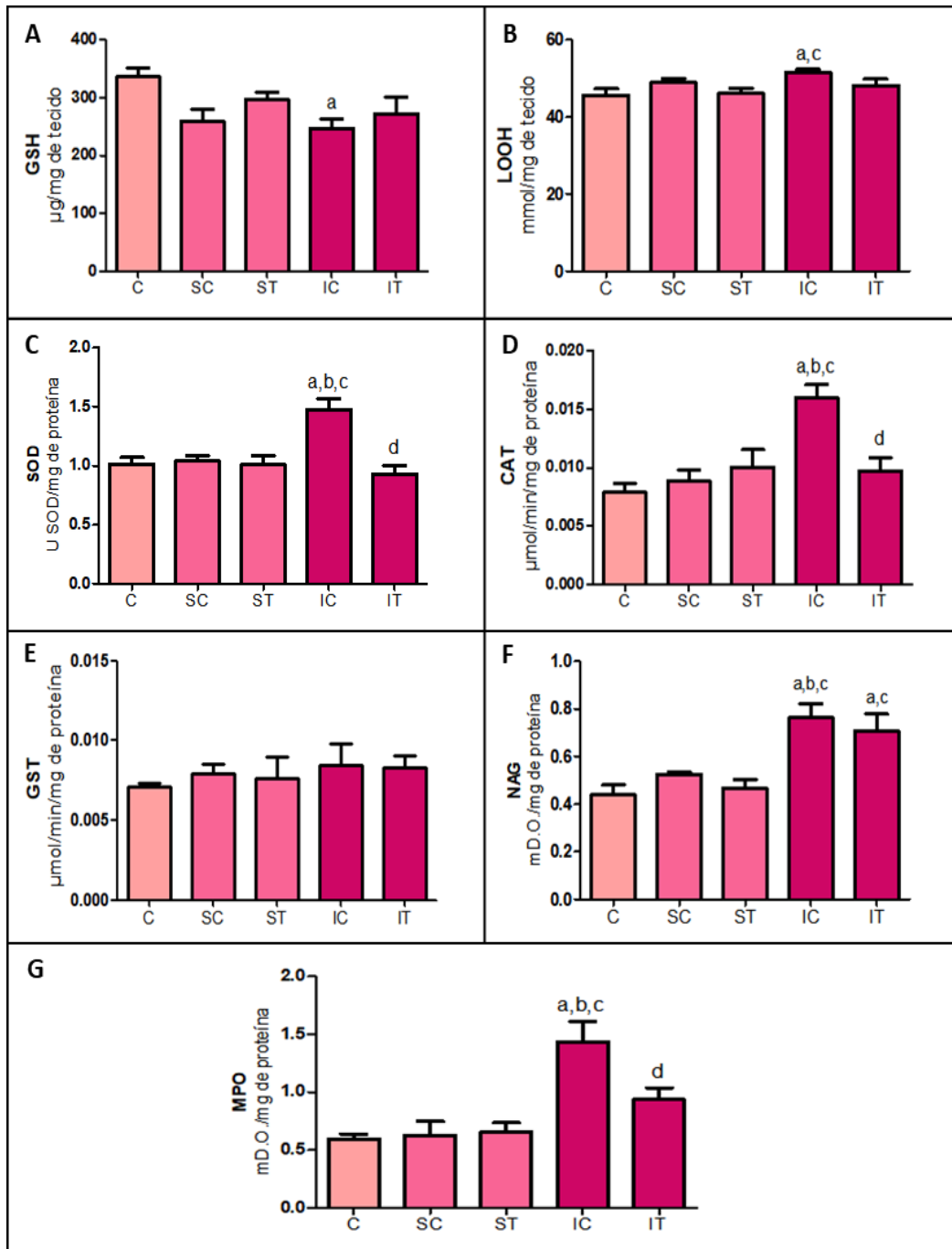
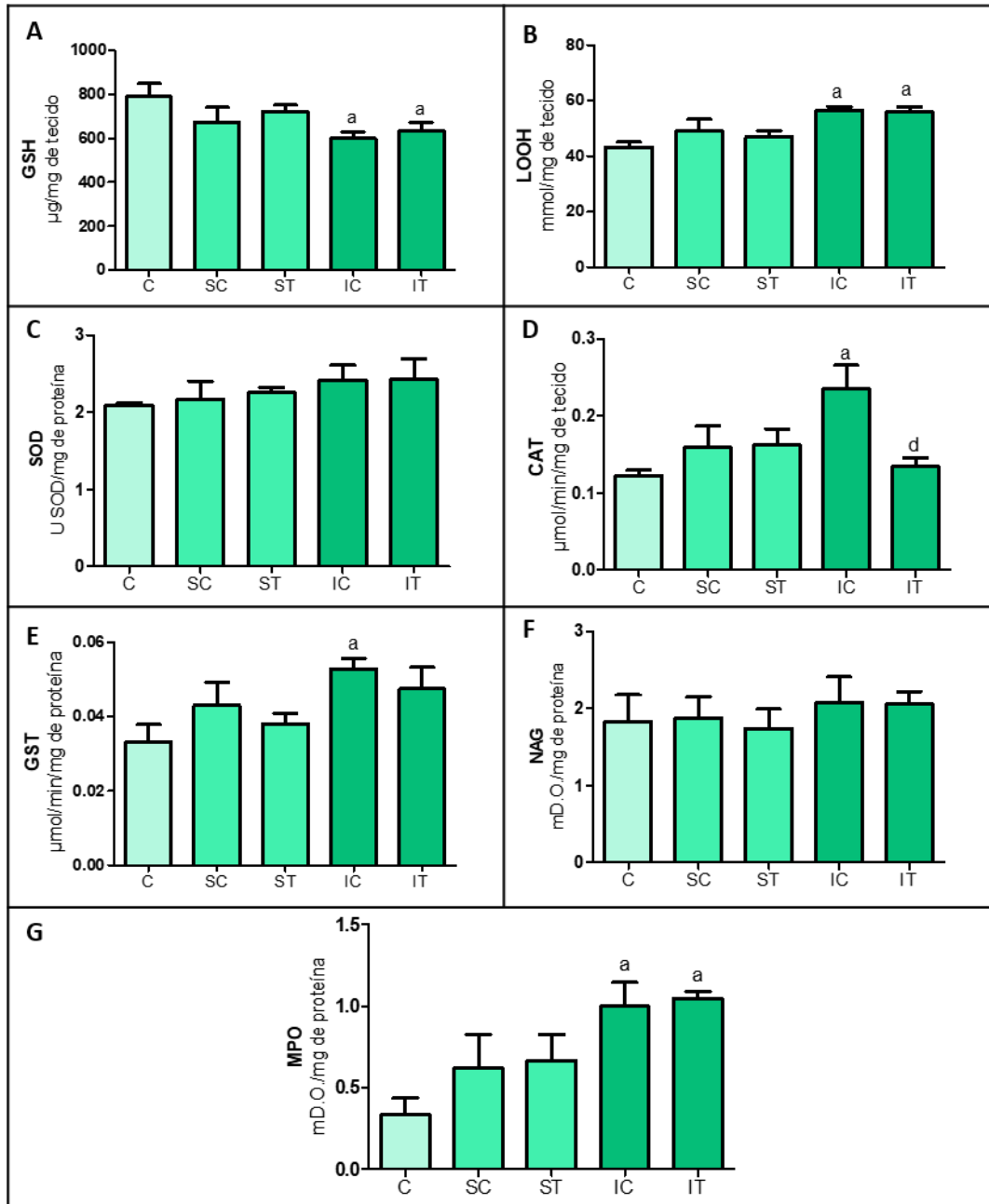


Figura 5



CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

O estudo do tratamento com curcumina sobre o íleo, fígado, pulmão e rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal demonstrou que:

- 1) A isquemia intestinal de 45 minutos, seguida de reperfusão de 72 horas provoca perda neuronal de neurônios nitrérgicos do plexo mientérico, aumento dos níveis de óxido nítrico no íleo, estresse oxidativo e inflamação nos órgãos, observados através da alteração dos parâmetros avaliados.
- 2) A curcumina, na dose de 40 mg/kg de peso corporal do animal, foi capaz de prevenir a maioria das alterações causadas pela IR intestinal, demonstrando atividade antioxidante e anti-inflamatória.
- 3) Cada órgão responde de uma forma diferente à IR intestinal. O íleo, pulmão e rim foram afetados em maior grau do que o fígado.
- 4) A resposta à ação protetora da curcumina também varia conforme o órgão, principalmente em decorrência da sua distribuição tecidual. Os órgãos mais sensíveis à ação antioxidante e anti-inflamatória da curcumina foram o íleo, pulmão e fígado.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Através dos resultados obtidos foi possível vislumbrar um panorama dos efeitos da isquemia e reperfusão intestinal em nível local e sistêmico, possibilitando o entendimento dos mecanismos pelos quais as lesões se desenvolvem. Desta maneira, é possível uma terapia que contemple todas as implicações geradas pela hipóxia tecidual. Ainda há um longo caminho a percorrer, as altas taxas de morbidade e mortalidade associadas à IR intestinal devem ser superadas e pesquisa por novas moléculas protetoras precisa continuar. A curcumina mostrou-se uma importante aliada na terapia para prevenir os efeitos deletérios da IR intestinal, entretanto ela possui limitações, sua baixa biodisponibilidade via oral dificulta a absorção e distribuição para os tecidos. Essa barreira pode ser superada utilizando formas farmacêuticas de liberação controlada, que aumentem a biodisponibilidade e potencializem os efeitos benéficos da curcumina.