



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

RAISSA STEFANY FERREIRA SOUSA

**INFLUÊNCIA DA CURCUMINA NA MORFOLOGIA E FUNÇÃO
HEPÁTICA DURANTE A SEPSE**

**Goiânia
2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

RAISSA STEFANY FERREIRA SOUSA

3. Título do trabalho

Influência da curcumina na morfologia e função hepática durante a sepse

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: **a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a); **b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Raissa Stefany Ferreira Sousa, Discente**, em 03/03/2026, às 09:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mara Rubia Nunes Celes, Professora do Magistério Superior**, em 06/03/2026, às 13:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo= informando o código verificador **6019555** e o código CRC **9D2D6A5F**

Referência: Processo nº 23070.019412/2021-28

RAISSA STEFANY FERREIRA SOUSA

**INFLUÊNCIA DA CURCUMINA NA MORFOLOGIA E FUNÇÃO
HEPÁTICA DURANTE A SEPSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás (UFG), para obtenção do Título de Mestra em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Área de concentração: Ciências básicas e aplicadas em doenças infecto-parasitárias e saúde pública: Patologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Mara Rubia Nunes Celes

**Goiânia
2021**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Sousa, Raissa Stefany Ferreira
INFLUÊNCIA DA CURCUMINA NA MORFOLOGIA E FUNÇÃO HEPÁTICA
DURANTE A SEPSE [manuscrito] / Raissa Stefany Ferreira Sousa. - 2021.
LIX, 59 f.: 2021

Orientadora: Prof(a). Dra. MARA RUBIA NUNES CELES
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós-Graduação em
Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2021.

Anexo.

Apêndice.

Bibliografia.

Inclui: lista de figuras, lista de tabelas.

1. CLP. 2. Lesão Hepática. 3. Sepses.

I. CELES, MARA RUBIA NUNES, orient. II. Título.

CDU 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE RAISSA STEFANY FERREIRA SOUSA – Aos trinta dia do mês de abril do ano de 2021 (30/04/2021), às 08h:30min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **MARA RUBIA NUNES CELES (IPTSP/UFG)**, **JONATHAS XAVIER PEREIRA (IPTSP/UFG)** e **ALINE DE ARAÚJO FREITAS (UniEvangélica)**, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada por **WEBCONFERÊNCIA**, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“INFLUÊNCIA DA CURCUMINA NA MORFOLOGIA E FUNÇÃO HEPÁTICA DURANTE A SEPSE”** em nível de **MESTRADO**, área de concentração em **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: PATOLOGIA**, de autoria de **RAISSA STEFANY FERREIRA SOUSA**, discente do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. **MARA RUBIA NUNES CELES**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1481/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada ou Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. **Mara Rubia Nunes Celes**

Prof. Dr. **Jonathas Xavier Pereira**

Profa. Dra. **Aline de Araújo Freitas**

Aprovada / Reprovada

APROVADA

APROVADA

APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Habilitada**, (**Habilitada** ou **não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRA EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: PATOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12h e 40min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA: Influência da curcumina na morfologia e função hepática durante a sepse.



Documento assinado eletronicamente por **Mara Rubia Nunes Celes, Professora do Magistério Superior**, em 30/04/2021, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Jonathas Xavier Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 30/04/2021, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º,

https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2174776&infra_sistema=1
... 1/2 14/07/2021 SEI/UFG - 2012092 - Ata de Defesa de Dissertação



§ 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline de Araújo Freitas, Usuário Externo**, em 30/04/2021, às 13:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2012092** e o código CRC **F41E6402**.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Raissa Stefany Ferreira Sousa

Orientador (a): Prof^a Dr^a Mara Rubia Nunes Celes

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Mara Rubia Nunes Celes

2. Prof. Dr. Jonathas Xavier Pereira

3. Prof(a). Dr(a). Aline de Araújo Freitas

Data: 30/04/2021

“É justo que muito custe o que muito vale”. (Santa Tereza D’Ávila)

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar à Deus por me conceder a oportunidade de fazer um curso de pós-graduação no qual foi tão sonhado.

À minha mãe, Maria José, por todos os conselhos, tamanho incentivo e cuidado. Ao meu pai, Ailton Carlos, por toda a confiança, apoio e auxílio sempre que precisava.

À minha irmã Larissa Suelen, por toda força, carinho e incentivo.

À Prof^a Mara Rubia Nunes Celes por todo convívio e acompanhamento de pesquisa científica, como orientadora agradeço pela paciência, instrução e aprendizagem.

Aos colegas de laboratório pela parceria, alegrias, companheirismo e crescimento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa e apoio financeiro (Processo nº 169721/2018-3).

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública por todo apoio e acolhimento.

A Universidade Federal de Goiás por todo o suporte e organização, contribuindo sempre para o melhor conhecimento.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1 Introdução.....	13
1.2 Sepsis: Epidemiologia e definições	14
1.3 Fisiopatologia da Sepsis.....	15
1.4 Efeitos da sepsis no fígado.....	18
1.5 Células de Kupffer.....	22
1.6 Curcumina	24
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivos gerais.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. MÉTODOS	28
4.1 Animais de experimentação e Delineamento experimental.....	28
4.2 Tratamento com curcumina	29
4.3 Indução de sepsis pelo método de CLP (<i>cecal ligation puncture</i>).....	29
4.4 Monitoramento do Estado Geral dos Animais	30
4.5 Avaliação da sobrevivência	31
4.6 Coleta e processamento do material para análise histológica.....	31
4.7 Análise histopatológica de HE.....	31
4.8 Análise histopatológica de PAS.....	32
4.9 Avaliação da função hepática (bioquímica sérica).....	32
4.10 Análise estatística.....	33
5. RESULTADOS	34
5.1 Avaliação do modelo de CLP.....	34
5.1.2 Avaliação qualitativa dos parâmetros clínicos	35
5.2 Morfologia hepática.....	36
5.2.1 Avaliação das alterações da arquitetura tecidual.....	36
5.2.2 Avaliação por escore de glicogênio PAS-positivo.....	40
5.2.3 Avaliação histopatológica de glicogênio PAS-positivo.....	40
5.3 Avaliação da lesão hepática.....	43
5.3.1 Avaliação da integridade celular: ALT, AST e Relação AST/ALT.....	43
5.3.2 Avaliação da síntese hepática: Proteínas totais, albumina e Relação, albumina/globulina.....	45
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	59
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética.....	59

QUADROS, TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura esquemática do fígado.....	19
Figura 2. Representação esquemática dos períodos de tratamento e coleta antes e após o início da CLP.....	29
Figura 3. Curva de sobrevivência dos camundongos submetidos a estímulo séptico grave (CLP) e de camundongos falso-operados (SHAM) tratados e não tratados com curcumina.....	34
Figura 4. Painel de fotomicrografias dos cordões de hepatócitos de camundongos C57/BL6 do grupo SHAM, SHAM+CUR (HE 10x e 40x), CLP e CLP+CUR 24-48h (HE 40x).....	36
Figura 5. Painel de fotomicrografias dos cordões de hepatócitos de camundongos C57/BL6 do subgrupo CLP e CLP+CUR 72h e 120h (HE, 400x).	38
Figura 6. Gráfico dos valores de escore de glicogênio PAS-positivo por tempo (horas).....	40
Figura 7. Painel de fotomicrografias dos cordões de hepatócitos de camundongos C57/BL6 com marcação positiva de glicogênio rosa púrpura a magenta, dos subgrupos SHAM, SHAM+CUR, CLP e CLP+CUR 24h e 48h (PAS, 10x).....	41
Figura 8. Painel de fotomicrografias dos cordões de hepatócitos de camundongos C57/BL6 com marcação positiva de glicogênio rosa púrpura a magenta, dos hepatócitos nos subgrupos CLP e CLP+CUR 72h e 120h (PAS, 10x).....	42
Figura 9. Gráfico do valor de ALT (U/L) por tempo (horas).....	43
Figura 10. Gráfico do valor de AST (U/L) por tempo (horas).....	44
Figura 11. Gráfico da relação AST/ALT (U/L) por tempo (horas).....	45
Figura 12. Gráfico do valor proteínas totais (g/dL) por tempo (horas).....	46
Figura 13. Gráfico do valor de albumina (U/L) por tempo (horas).....	47
Figura 14. Gráfico da relação albumina/globulina (U/L) por tempo (horas).....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros clínicos gerais avaliados nos grupos de animais experimentais.....	30
Quadro 2. Parâmetros e escores utilizados na avaliação de HE.....	32
Quadro 3. Escores utilizados na avaliação de PAS.....	32
Quadro 4. Avaliação clínica do estado geral dos animais.....	35

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Valores dos escores avaliados nos parâmetros dos subgrupos CLP e CLP+CUR.....	39
--	----

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

SIRSSíndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
UTIUnidade de Terapia Intensiva
TLR-4Receptor do tipo Toll 4(<i>Toll-like receptor 4</i>)
LPSLipopolissacarídeo
NFK βFactor Nuclear Kappa Beta (<i>Factor nuclear kappa B</i>)
NOÓxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NKCélulas Natural Killer (<i>Natural Killer</i>)
TNF αFator de Necrose Tumoral Alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)
IL-Interleucina 1,1 α/β , 6, 12, 18, 4, 10
GCSFFator Estimulador de Colônias Granulocitárias(<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>)
GM-CSFFator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (<i>The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
TGF- βFator de Crescimento Transformante Beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
MCP-1.	..Proteína-1 Quimioatraente de Monócitos (<i>The monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MIP-2AProteína Inflamatória 2-alfa dos Macrófagos (<i>Macrophage inflammatory protein 2 alpha</i>)
iNOSÓxido Nítrico Sintase (<i>Nitric oxide synthase</i>)
ROSEspécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species)
PD1Proteína de Morte Celular (<i>Programmed cell death protein 1</i>)
PD-L1Programada Ligante de Morte 1 (<i>Programmed death-ligand 1</i>)
TregsLinfócitos T Reguladores (<i>Regulatory T cells</i>)
HEHematoxilina e Eosina
ASTAspartato Aminotransferase
ALTAlanina Aminotransferase
DAMPs	...Padrões moleculares associados ao dano (<i>Damage-associated molecular pattern</i>)
PRRsPadrões Moleculares Associados a Danos (<i>Pattern recognition receptors</i>)
ADPAdenosina Difosfato
HLA-DRSistema antígeno leucocitário humano (<i>Human leukocyte antigen</i>)
AP-1Proteína ativadora 1 (<i>Activator protein 1</i>)

RESUMO

INFLUÊNCIA DA CURCUMINA NA MORFOLOGIA E FUNÇÃO HEPÁTICA DURANTE A SEPSE

Palavras-chave: clp, lesão hepática, sepse.

Considerada um problema de saúde pública grave, a sepse possui caráter sistêmico, progressão rápida e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade. Apesar dos recentes avanços no diagnóstico e na terapêutica, a evolução do quadro séptico cursa com lesão e disfunção em diversos órgãos, incluindo o fígado. A resposta imune exacerbada com produção excessiva de mediadores inflamatórios pode lesionar e comprometer o tecido hepático, suas funções e, conseqüentemente a melhora do paciente. As células de Kupffer estão diretamente envolvidas na mediação de tal resposta, pois desempenham uma grande plasticidade como característica, são capazes de ativarem em diferentes perfis como, pró-inflamatório M1, com produção de óxido nítrico (NO) e/ou anti-inflamatório M2, com produção de arginase. Uma das formas promissoras de terapia da sepse é o uso de substâncias naturais, como a curcumina, pois possui funções anti-inflamatórias e antioxidantes relevantes, e estudos indicam suacapacidade de reduzir os efeitos nocivos provocados pela resposta inflamatória nasepse. Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito da curcumina sobre as alterações morfológicas e funcionais ocorridas no fígado de camundongos submetidos à sepse experimental induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP). Para isto, foram utilizados camundongos machos, adultos, da linhagem C57Bl/6 e divididos em grupos de animais: falso-operados (SHAM), falso-operados e tratados com CUR (SHAM+CUR), animais submetidos à sepse (CLP) e animais submetidos à sepse e tratados com CUR (CLP+CUR). Os grupos foram subdivididos em tempos de 24, 48,72 e 120 horas. Após cada período experimental, os animais dos diferentes grupos foram anestesiados e eutanasiados. Em seguida, o fígado foi excisado, processado e corado com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica e com PAS (ácido periódico + reativo de Schiff) para avaliação de depósitos de glicogênio. Para avaliação da função hepática o sangue dos animais foi coletado sem anticoagulantes, o soro obtidofoi alíquotado, identificado e acondicionado em freezer -80°C até o momento da mensuração das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), albumina e globulina. Na avaliação histopatológica de HE, foi possível observar que nos grupos CLP+CUR 48h e 72h a esteatose reduziu em relação aos subgrupos CLP 48h e 72h. Na avaliação histopatológica de PAS foi possível observar áreas moderadas de glicogênio nos grupos CLP+CUR 72h e 120h, em relação aos subgrupos CLP 72h e 120h. Os marcadores bioquímicos de integridade dos hepatócitos (AST, ALT e AST/ALT), mostraram que a curcumina reduziu as enzimas de lesão hepática, prevenindo o dano hepático. Na avaliação dos parâmetrosbioquímicos de síntese e metabolismo hepático (Albumina, proteínas totais e Alb/Glob),mostrou que a curcumina estimulou as funções de síntese do fígado, aumentando a produção de proteínas. Foi possível concluir que a curcumina conseguiu reduzir oaparecimento de lesões e danos ao tecido hepático durante a sepse, preservando parcialmente a sua integridade e funcionalidade. Foi também capaz de prevenir a redução dos níveis de glicogênio durante a sepse.

ABSTRACT

INFLUENCE OF CURCUMIN ON LIVER MORPHOLOGY AND FUNCTION DURING SEPSIS

Keywords: clp, liver damage, sepsis.

Considered a serious public health problem, sepsis has a systemic character, rapid progression and is associated with high rates of morbidity and mortality. Despite recent advances in diagnosis and therapy, the evolution of the septic condition leads to injury and dysfunction in several organs, including the liver. The exacerbated immune response with excessive production of inflammatory mediators can damage and compromise the liver tissue, its functions and, consequently, the patient's improvement. Kupffer cells are directly involved in mediating such a response, as they play a great plasticity as a characteristic, they are able to activate in different profiles such as pro-inflammatory M1, with production of nitric oxide (NO) and / or anti-inflammatory M2, with arginase production. One of the promising forms of sepsis therapy is the use of natural substances, such as curcumin, as it has relevant anti-inflammatory and antioxidant functions, and studies indicate its ability to reduce the harmful effects caused by the inflammatory response in sepsis. Therefore, the objective of this work is to evaluate the effect of curcumin on the morphological and functional changes that occurred in the liver of mice submitted to experimental sepsis induced by ligation and perforation of the cecum (CLP). For this purpose, adult male C57Bl / 6 mice were used and divided into groups of animals: false-operated (SHAM), false-operated and treated with CUR (SHAM + CUR), animals subjected to sepsis (CLP) and animals submitted to sepsis and treated with CUR (CLP + CUR). The groups were divided into 24, 48, 72 and 120 hours. After each experimental period, the animals in the different groups were anesthetized and euthanized. Then, the liver was excised, processed and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological analysis and with PAS (periodic acid + Schiff's reactive) to assess glycogen deposits. For the assessment of liver function, the blood of the animals was collected without anticoagulants, the serum obtained was aliquoted, identified and stored in a freezer at -80°C until the measurement of the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), albumin and globulin. In the histopathological evaluation of HE, it was possible to observe that in the CLP + CUR 48h and 72h groups, cell lesions and steatosis decreased in relation to the 48h and 72h CLP subgroups. In the histopathological evaluation of PAS it was possible to observe moderate areas of glycogen in the CLP + CUR 72h and 120h groups, in relation to the CLP 72h and 120h subgroups. Biochemical markers of hepatocyte integrity (AST, ALT and AST / ALT), showed that curcumin reduced the enzymes of liver damage, preventing liver damage. In the evaluation of the biochemical parameters of hepatic synthesis and metabolism (Albumin, total proteins and Alb / Glob), it showed that curcumin stimulated the liver's synthesis functions, increasing protein production. It was possible to conclude that curcumin was able to reduce the appearance of lesions and damage to liver tissue during sepsis, partially preserving its integrity and functionality. It was also able to prevent the reduction of glycogen levels during sepsis.

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A sepse representa uma das principais causas de morte nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), apesar dos recentes avanços no diagnóstico e na terapêutica. (ALMEIDA; PALMER., 2019). Considerada também como a principal geradora de custos nos setores público e privado, tal fato ocorre devido à necessidade de se utilizar equipamentos sofisticados, medicamentos caros e exigir muito trabalho da equipe médica (ALMEIDA; PALMER., 2019; MACHADO et al., 2017).

Com a evolução do quadro séptico, ocorre uma reação em cadeia que leva ao comprometimento hemodinâmico, desequilíbrio hidroeletrólítico, volêmico e metabólico do paciente (ALMEIDA; PALMER., 2019). Ainda, as formas mais graves da sepse podem causar disfunção de um ou mais órgãos, incluindo fígado com disfunção metabólica grave e potencialmente fatal. Neste contexto, o fígado responde imunologicamente de forma exacerbada, com produção excessiva de mediadores pró e anti-inflamatórios que podem lesionar e comprometer tecido hepático, suas funções e, conseqüentemente, a melhora do paciente (LI et al, 2017; TACKE, ZIMMERMANN et al, 2014).

Na sepse, o estudo contínuo dos mecanismos celulares e moleculares diretamente associados à disfunção hepática é fundamental, pois torna possível a proposição de novos alvos terapêuticos com finalidade de cessar ou reverter o quadro instalado (WANG et al, 2014). Neste contexto, o uso de substâncias naturais com possível “ação terapêutica” surge como uma alternativa promissora no campo de pesquisa da sepse, como por exemplo, a curcumina, com propriedades farmacológicas que incluem ação antioxidante e anti-inflamatória (WANG et al, 2014; NESSELER et al, 2012).

As ações antioxidante e anti-inflamatória da curcumina podem induzir a redução dos efeitos nocivos provocados pelo aumento da ativação de macrófagos hepáticos na sepse, influenciando assim a resposta imune frente a um quadro séptico (VACHHARAJANI et al, 2010; SAVCUN et al, 2013). Dessa forma, o uso da curcumina evidencia a necessidade do desenvolvimento de estudos que possam contribuir para novas abordagens terapêuticas na sepse.

1.1 SEPSE: EPIDEMIOLOGIA E DEFINIÇÕES

Devido as irregularidades ainda existentes quanto a definição específica sobre sepse, a detecção do microrganismo infectante causador, a notificação contínua dos casos e recursos para terapia intensiva, a real incidência dos casos de sepse em diversos países ainda não é bem conhecida e apresenta na literatura variedades de incidência a cada estudo (CECCONI et al., 2018; VERDONK et al., 2017). A maioria dos dados sobre a incidência de sepse advém de países de alta renda, entretanto existem estimativas muito pequenas em países de baixa renda, onde a ocorrência de mortes acaba sendo grande devido à falta de recursos necessários para suporte clínico específico ao paciente (CECCONI et al., 2018).

A taxa de mortalidade por sepse no Brasil chegou a 55,7% em 2015, segundo dados de uma pesquisa feita em 229 Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. (MACHADO et al., 2017). Se comparado a outros países, como a França, que obteve taxa de mortalidade de cerca de 30,4%, Estados Unidos com 29% e Austrália com 18% no mesmo estudo, o Brasil ficou entre os países com maior índice de mortalidade no mundo. Segundo o mesmo estudo, dados como esse refletiram em dois fatores: 1) a insustentável tarefa que os países subdesenvolvidos possuem em atender com êxito, todas as exigências de suporte clínico necessário a um paciente séptico e; 2) a ausência de definições esclarecedoras da doença por parte da equipe multiprofissional (MACHADO et al., 2017).

Ao longo dos anos, várias tentativas para uniformização dos critérios clínicos e definição da sepse têm sido feitas. Em 1992, um esforço conjunto entre a *Society Critical Care Medicine (SCCM)* e o *American College of Chest Physicians (ACCP)*, foi realizado no sentido de padronizar nomenclatura e definições associadas à evolução da sepse (BARBOSA et al., 2004; VERDONK et al., 2017). Assim, a sepse foi definida como uma síndrome clínica complexa com múltiplas anormalidades fisiológicas e imunológicas causadas pela resposta imune do hospedeiro frente à presença de um microrganismo ou partes do mesmo na corrente sanguínea, associada à presença de inflamação sistêmica (SIRS) (MACHADO et al., 2017; BONE et al., 1992). Entretanto, com a crescente discussão sobre a definição dos parâmetros de sepse e a possibilidade de que os mesmos poderiam levar a diagnósticos inespecíficos, tais como, quadros

infeciosos graves, trauma ou pancreatite, uma segunda conferência consenso foi realizada em 2001 com a intenção de esclarecer as definições sobre a sepse e torná-las mais sensíveis e específicas (MACHADO et al., 2017; VERDONK F et al., 2017).

Embora a sepse tenha sido definida como uma síndrome inflamatória sistêmica, associada à presença de um foco de infecção, os ensaios clínicos dirigidos às abordagens terapêuticas, tanto anti-inflamatórias quanto antibactericidas, falharam amplamente na identificação de novos alvos terapêuticos eficazes para melhorar os resultados clínicos. Por esta razão, em 2016, um terceiro consenso internacional sobre sepse foi realizado pelas *Society of Critical Care Medicine - SCCM* e a *European Society of Intensive Care Medicine – ESICM*, que publicaram estudos fazendo atualizações das definições sobre a sepse e choque séptico (SINGER et al., 2016; MACHADO et al., 2017). Após essa reunião, a nova definição de sepse foi atualizada sendo definida como uma disfunção orgânica instalada em consequência do desequilíbrio da resposta imune do hospedeiro frente a uma infecção. (SINGER et al., 2016).

A nova definição de sepse foi elaborada levando-se em consideração uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da sepse e da falência orgânica resultante, e o desenvolvimento de terapias dirigidas à prevenção ou limitação de eventos moleculares associados à falência progressiva de órgãos (BERGD, GERLACH H, 2018). Portanto, a evolução de um paciente séptico depende de fatores importantes como intensidade da resposta imunológica, particularidades do agente causador, presença de doenças de base e susceptibilidade a outras patologias por imunossupressão ou por influência genética intrínseca do indivíduo (SINGER et al., 2016).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

Para o entendimento da fisiopatologia de uma doença são necessárias definições claras da sua patogênese, mecanismo de ação e consequências para o organismo do indivíduo (ALMEIDA; PALMER., 2019). A sepse é uma doença antiga que, por muito tempo, não se sabia sua causa e índices de mortalidade e, mesmo com o avanço da medicina e o emprego de definições universais, a sepse ainda é um desafio para definir, reconhecer e tratar adequadamente o paciente (SALOMÃO et al, 2019).

A patogênese sepse envolve uma sequência de eventos que o organismo é capaz de desenvolver frente à presença de um agente infeccioso, direcionados para uma resposta imune desregulada, mediada por citocinas, quimiocinas e ativação generalizada de leucócitos, que provocam danos aos tecidos e evolução para disfunção orgânica (SALOMÃO et al, 2019). Ainda não é possível compreender e descrever totalmente a fisiopatologia da sepse, entretanto, seu início envolve o reconhecimento de patógenos ou partes dos mesmos, como componentes da parede celular: lipopolissacarídeo (LPS), exotoxinas, ácido lipoteicóico, peptidoglicanos, etc. Esse reconhecimento é seguido pela ativação de receptores celulares que atuam desencadeando uma resposta inflamatória (PORTELA, 2010; SALOMÃO et al, 2019; CHENG et al, 2020).

Os receptores presentes nas células do sistema imune inato são responsáveis por reconhecer antígenos associados aos patógenos, denominados “Padrões Moleculares Associados a Patógenos” (PAMPs) ou ainda reconhecer antígenos associados à lesão celular, denominados “Padrões Moleculares Associados a Danos” (DAMPs). Após a ligação dos PAMPs e/ou DAMPs aos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), localizados na superfície celular ou no citosol das células imunes inatas, os mesmos emitem sinais intracelulares que culminam em ativação gênica específica, transcrição de RNA e produção de mediadores inflamatórios (LELUBRE, VICENTE et al, 2018). Assim, mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF, IL-6 e IL-1, produzidos pela ativação das células inflamatórias, vão atuar diretamente sobre células endoteliais, proporcionando diversos eventos como: vasodilatação com produção de óxido nítrico (NO), ativação do sistema de coagulação, rolagem e extravasamento de componentes inflamatórios para o espaço extravascular, possibilitando a amplificação da resposta pró-inflamatória (LELUBRE, VICENTE et al, 2018). A vasodilatação arteriolar sistêmica reduz a perfusão tecidual e causa hipóxia, iniciando lesões degenerativas e necróticas em diversos órgãos, o que contribui progressivamente para sepse grave (hipoperfusão) e choque (hipotensão e falência de múltiplos órgãos). Tais lesões são agravadas pela produção de radicais livres e pela liberação de enzimas por fagócitos aderidos ao endotélio, sobretudo nos pulmões e fígado. Em consequência, surgem acidose (aumento do ácido lático por incremento da glicólise anaeróbica), oligúria e alterações no estado de consciência e, juntos esses elementos também contribuem para o estado de choque (SALOMÃO et al, 2019).

A evolução da sepse acontece quando a resposta pró-inflamatória suplanta a resposta anti-inflamatória. Como consequência, há o desencadeamento da produção de

fatores pró-coagulantes, enquanto fatores anticoagulantes naturais, tais como proteína C ativada, a anti-trombina e o fator inibidor tecidual são diminuídos em pacientes sépticos, resultando em um estado pró-coagulante com múltiplos microtrombos e obstrução de pequenos vasos, podendo levar a coagulação intravascular disseminada (CIVD) (SALOMÃO et al, 2019). Em específico, a citocina IL-6 contribui para uma resposta de fase aguda no fígado, com aumento da produção de proteína C reativa, e supressão de albumina e globulina. (HENKIN et al., 2009; CRAY et al., 2009; QUIN et al., 2018). As complicações ocorridas na circulação juntamente com a intensa produção de mediadores inflamatórios e o desequilíbrio de respostas pró e anti-inflamatória levam a disfunção de múltiplos órgãos, afetando sobretudo, os rins, pulmão, coração e o fígado (LELUBRE; VICENT, 2018).

A resposta inflamatória desencadeada por uma infecção deve ser precisamente regulada. Entretanto, durante a sepse há liberação maciça de mediadores pró-inflamatórios e, em contrapartida, ocorre síntese de grande quantidade de mediadores anti-inflamatórios, os quais tentam reduzir os efeitos da inflamação sistêmica. A produção elevada de TGF- β , IL-10 e IL-4 e a liberação de corticoides endógenos e certos metabolitos (p. ex., ADP e adenosina) conduzem a um estado de imunossupressão, com redução drástica das respostas imune inata e adquirida (SALOMÃO et al, 2019). Em pacientes, nos quais a infecção persiste de 24 a 48h a resposta anti-inflamatória aumenta, causando uma imunossupressão induzida pela sepse, ponto crítico de mortalidade e vulnerabilidade a outras infecções (ALMEIDA; PALMER., 2019).

A evolução da sepse para o choque séptico depende não somente da agressão, mas também da capacidade de resposta do organismo (HOTCHKISS RS, 2003). Em estudos experimentais, mutações em receptores e capacidade de produzir mediadores pró- e anti-inflamatórios têm importância na instalação e evolução da sepse (LELUBRE; VICENT, 2018). Estudos avaliando as funções imunológicas das células do sangue periférico evidenciaram um amplo comprometimento da resposta: monócitos de pacientes sépticos demonstraram diminuição da expressão de HLA-DR, produção de TNF-a e IL-6 após estimulação in vitro. Os neutrófilos apresentaram diminuição da quimiotaxia, fagocitose e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, mais importante, diminuição da contagem de linfócitos com funcionalidade reduzida durante a sepse (RIGATO O, 2003; ALVES-FILHO JC, 2003). No entanto, apesar de todos os avanços no estudo da fisiopatologia da sepse, faltam ainda elementos para que se possa

estabelecer com segurança a conceituação e os mecanismos de instalação e de progressão do que se denomina resposta inflamatória sistêmica e sua relação com a disfunção progressiva de órgãos (HOTCHKISS RS, 2003).

1.3 EFEITOS DA SEPSE NO FÍGADO

Embora a disfunção possa ocorrer em qualquer órgão, em pacientes com sepse a disfunção em alguns órgãos tem consequências graves para o organismo e, por isso geralmente são monitorados na prática clínica (LELUBRE; VICENT, 2018). Durante a sepse, não apenas a infecção em si, mas também a hiperatividade da resposta inflamatória, a insuficiência micro circulatória e os efeitos colaterais da terapia são responsáveis pela lesão hepática.

O fígado desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase. Suas funções incluem: metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e hormônios; biossíntese de componentes do sangue, enzimas e fatores de coagulação; produção de bile; desintoxicação; metabolismo de compostos de nitrogênio (síntese de ureia); armazenamento de glicogênio, colesterol, vitaminas (A, D, B12) e ferro. Além de estar envolvido no catabolismo e anabolismo de substâncias, o fígado está envolvido na resposta imunológica e regulação de processos inflamatórios com função crítica na depuração de componentes tóxicos e bactérias (SCHINONI, 2006; GAO., 2016).

O tecido hepático é organizado em células funcionais básicas (Figura 1) denominadas hepatócitos, dispostos predominantemente em cordões e separados por sinusoides venosos que se anastomosam formando os lóbulos hepáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Devido à diversidade morfofuncional e considerável heterogeneidade das regiões hepáticas, o entendimento da unidade funcional, da microcirculação e do zoneamento metabólico do fígado (zonas 1, 2 e 3) são essenciais para a descrição correta dos processos patológicos que agredem o tecido, o que contribui para um diagnóstico mais preciso (SOARES FILHO et al., 2012). A zona 1 fica próxima ao espaço porta, é rica em oxigênio e nutrientes; a zona 3, próxima à veia central, é pobre em oxigênio; e a zona 2 é intermediária em relação à quantidade de oxigênio e nutrientes (SOARES FILHO et al., 2012).

Os hepatócitos, denominadas células epiteliais do fígado, realizam as principais atividades metabólicas. Os colangiócitos revestem o lúmen dos ductos biliares. Células

estrelares possuem papel no armazenamento de vitamina A organização e deposição de colágeno. Células endoteliais sinusoidais facilitam a troca de proteínas e partículas entre o plasma e os tipos celulares constituintes. Células natural killer (NK) estão associadas à citotoxicidade contra agentes virais e células tumorais, e entre as funções imunológicas estabelecidas as células de Kupffer representam a maior parte do sistema fagocítico mononuclear (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; TREFTS et al., 2016).

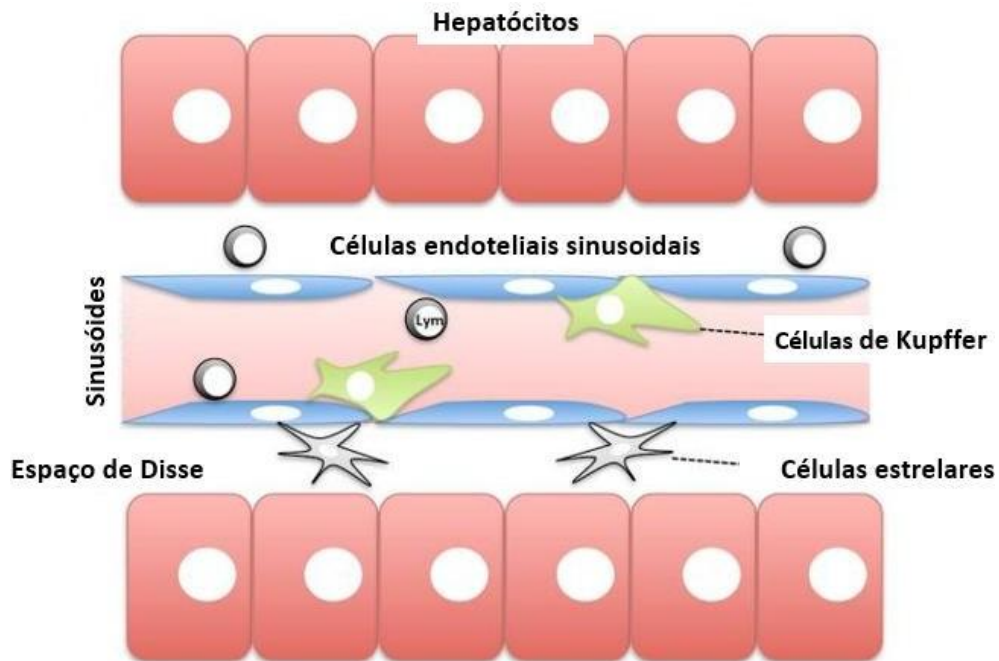


Figura 1. Estrutura esquemática do fígado. (Adaptado de: TSUTSUI; NISHIGUCHI, 2014)

O fígado durante a sepse exerce dois tipos de imunidade, a imunidade tipo 1 é caracterizada por atividade de fagocitose, ativação de linfócitos T auxiliares com produção das citocinas IFN e IL-2. A imunidade tipo 2 envolve a resolução da inflamação, ativação de linfócitos T auxiliares com produção das citocinas IL-4 e IL-10 e cicatrização de feridas (STRNAD et al, 2016). Devido à sua elevada vascularização, as funções imunológicas frente a processos inflamatórios são intensificadas, fazendo com que o combate de uma lesão passe de uma resposta inicial a uma resposta exacerbada, podendo evoluir para uma resposta imunológica desequilibrada (SCHINONI., 2006).

Ainda, depuração de agentes bacterianos por células imunes é reduzida quando a resposta a esses agentes é exacerbada, podendo ocasionar lesão ao tecido hepático

(NESSELER et al, 2012). Frente ao processo séptico, o fígado age como uma “espada de dois gumes”. Ao mesmo tempo em que a resposta imunológica mediada pelo fígado é responsável pelo *clearance* de bactérias e toxinas, também pode causar inflamação, imunossupressão e lesão hepatocelular, a qual pode progredir para a desorganização da arquitetura tecidual, podendo culminar em disfunção hepática (YAN et al., 2015, STRNAD et al., 2016). Em resposta a lesão celular há o aumento de permeabilidade dos hepatócitos, assim diferentes enzimas são liberadas para o espaço extracelular, iniciando a ocorrência de lesão (LESCOT et al., 2012). A lesão hepatocelular pode ser reversível ou levar a morte celular, ela é avaliada pela elevação das enzimas intracelulares: *alanina aminotransferase* (ALT), específica de lesão hepática aguda, e *aspartato aminotransferase* (AST), inespecífica de lesão hepática crônica (LESCOT et al., 2012; STRNAD et al., 2016). Da mesma forma, as funções de síntese hepática na sepse também se encontram alteradas, aumentando a produção de proteínas, como albumina e globulina (STRNAD et al., 2016).

A disfunção hepática associada a sepse é caracterizada comumente em pacientes em estados tardios e críticos da sepse, devido ao choque e a hipoperfusão inicial do tecido, como parte da disfunção de múltiplos órgãos. (WANG et al, 2014; NESSELER et al, 2012). A disfunção hepática na sepse se resume na tentativa do fígado de eliminar endotoxinas e bactérias, sintetizar proteínas para as funções metabólicas, coagulação, aumento da resposta inflamatória e a desintoxicação (NESSELER et al, 2012; STRNAD, 2016).

Inicialmente, há uma regulação positiva para a produção de proteínas de fase aguda impulsionada pela IL-6, são produzidas em aumento o fibrinogênio, haptoglobina, protrombina, proteínas C-reativa e α -1-antitripsina, em contrapartida, a transferência de antitrombina, e albumina estão reduzidas e a via da proteína C está inibida (NESSELER et al, 2012). Em relação ao metabolismo hepático, há o aumento da captação de aminoácidos, e estimulação para glicogenólise e gliconeogênese, isso contribui para que o metabolismo hepático se altere e conseqüentemente também a função hepática (NESSELER et al, 2012; STRNAD, 2016; WANG et al, 2014).

Dessa forma, a disfunção hepática ocorre quando as barreiras celulares de evasão contra microrganismos já não são fisiologicamente aptas para a manutenção da homeostase hepática, levando à disfunção grave do órgão, e caso não haja intervenção poderá evoluir para morte do paciente (DHAINAUT et al., 2001; WANG et al, 2014). Estudo realizado por Koskinas et al., (2008) mostrou que pacientes sépticos sem história

prévia de doença hepática, apresentaram alterações histopatológicas importantes no fígado, como inflamação portal, necrose centro lobular e apoptose hepatocelular (KOSKINAS et al. 2008).

Dentre as funções metabólicas e respostas imunológicas contra agentes infecciosos orquestradas no fígado, os principais tipos celulares envolvidos são os hepatócitos, as células endoteliais e as células de Kupffer, as quais representam a maior parte do sistema fagocítico mononuclear (DHAINAUT et al., 2001). Os hepatócitos exibem receptores para muitos mediadores (TNF α , IL-1 e IL-6), além de participarem do metabolismo de aminoácidos, gliconeogênese, síntese e liberação de fatores de coagulação, do sistema complemento, enzimas anti-proteolíticas e outras diversas funções. Somado a esse cenário de resposta imunológica, células endoteliais também possuem papel na produção de fatores pró-coagulantes e pró-inflamatórios (DHAINAUT et al., 2001).

As primeiras células precursoras dos macrófagos advêm do saco vitelino, na circulação elas são denominadas monócitos e quando migram para os tecidos se tornam células maduras, denominadas macrófagos. Os macrófagos do tecido hepático são as células de Kupffer, são macrófagos residentes do fígado, nos quais a partir de monócitos se tornam macrófagos específicos do fígado. (GENTEK et al., 2014). Quando chegam ao tecido hepático são estimuladas por fatores de crescimento, conseguem assim atingir o seu maior estágio de amadurecimento como uma célula residente do tecido hepático, e se especializar em suas funções específicas (GENTEK et al., 2014; STRNAD, 2017).

Comumente encontradas em locais de lesão, os macrófagos são capazes de estimular a resposta pró-inflamatória e influenciar a eliminação de agentes agressores (STRNAD, 2017). As células de Kupffer são as principais responsáveis pela depuração de produtos bacterianos provenientes do intestino e da circulação portal, possuindo um papel importante na inflamação (DIXON et al., 2013; TACKE, ZIMMERMANN et al., 2014). Juntamente com outros macrófagos recrutados, possuem a capacidade de iniciar e regular a resposta inflamatória através da liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF α , IL-1 α e β , IL-8, IL-12, IL-18, G-CSF e GM-CSF, bem como a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-1, IL-4, IL-10 e TGF- β), delimitando e direcionando a resposta inflamatória (DIXON et al., 2013; DHAINAUT et al., 2001). Quando ativados dispõem principalmente na produção de alguns mediadores, tais como, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), quimiocinas (MCP-1 e MIP-2a), espécies reativas de oxigênio, nitrogênio, mediadores peptídicos e eicosanóides,

responsáveis por recrutar outras células inflamatórias da circulação para o fígado na tentativa de combater os agentes causadores (GADDAM et al, 2017).

1.4. CÉLULAS DE KUPFFER

Descobertos por Karl Wilhelm von Kupffer, em 1876, os macrófagos residentes do fígado ou células de Kupffer, estão localizadas nos sinusóides hepáticos e no lúmen do endotélio. Estas células estão sendo redescobertas como mediadoras críticas de lesão e reparo tecidual, por exibirem uma alta plasticidade diante do ambiente metabólico e imunológico no local em que se encontram (TACKE; KRENKEL, 2017). As células de Kupffer possuem uma localização vantajosa, pois permitem o contato com várias outras células da circulação, dentre elas as células NK e os linfócitos, possibilitando uma maior interação celular e ampliando suas funções quando ativadas (TSUTSUI; NISHIGUCHI et al, 2014).

As células de Kupffer podem ser ativadas em direção a dois perfis de resposta, isso depende do ambiente ao qual estão sujeitos (ZHANG et al, 2018). São classificadas em dois tipos principais, em macrófagos M1, pró-inflamatório ou classicamente ativado e M2, anti-inflamatório, alternativamente ativado ou imunomodulador, os quais se distinguem pela expressão de marcadores de superfície celular, produção de fatores específicos e suas atividades biológicas (ZHANG et al, 2018; TACKE, ZIMMERMANN et al, 2014). O perfil M1, é induzido por IL-12, IFN- γ e LPS e produz citocinas com perfil Th1 (TNF, IL-1 β , IL-12), e espécies reativas de oxigênio. O perfil M2, é induzido por IL-4 e IL-13, com produção de citocinas Th2 (IL-10, TGF- β , IL-4, IL-13), e arginase. (LI et al, 2017; TACKE, ZIMMERMANN et al, 2014).

Na sepse a resposta Th1 está aumentada, exibindo ativação de macrófagos M1 e grande produção de óxido nítrico (NO), em comparação aos níveis de arginase e consequentemente resposta Th2 por macrófagos M2 (LI et al, 2017). O fenótipo M1 tem como potente ativador o lipopolissacarídeo – LPS, direcionando para a produção de citocinas do tipo Th1, como TNF- α , IL-6, IL-12 e produção aumentada de (NO), via óxido nítrico sintase induzível (iNOS). O metabolismo da enzima iNOS, necessita da L-arginina como substrato e o principal produto gerado em cada reação a molécula de NO. O principal papel desse perfil de macrófago, em condições de equilíbrio e ausência de

resposta exacerbada, é defender o hospedeiro contra patógenos (DIXON et al., 2013; TACKE; KRENKEL, 2017; ZHANG et al, 2018).

O fenótipo M2 tem como alvo o reparo tecidual, favorecendo um ambiente de baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias e conduzindo para o aumento da produção e liberação de mediadores anti-inflamatórios do tipo Th2, a exemplo, a expressão de receptores para IL-10 e IL-4 e alta expressão de arginase I. A arginase é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise de L-arginina em L-ornitina e ureia. A L-ornitina é uma enzima importante no reparo tecidual pela sua participação na produção de colágeno, auxiliando na reestruturação tecidual (DIXON et al., 2013). A arginase I é encontrada abundantemente no fígado e quando há aumento da sua expressão em uma resposta imune, a síntese de NO é prejudicada, pois tanto a iNOS como a arginase competem pelo substrato L-arginina, o sinal para cicatrização da inflamação é então estimulado. (DIXON et al., 2013; DUNARTE, et al, 2007).

As células de Kupffer suportam, em condições normais, um fenótipo tolerogênico. Todavia, frente a insultos como toxinas e antígenos, elas perdem o equilíbrio de tolerar as essas substâncias e passam para um estado patologicamente ativo, sobretudo em processos inflamatórios como a sepse. (DIXON et al., 2013). Nesse cenário, passa a ser uma importante fonte de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, NO, enzimas lisossomais e proteolíticas, eicosanoides e superóxidos (KOLIOS et al, 2006). Na sepse há o aumento excessivo de ativação de macrófagos M1, e a progressão da produção desregulada de mediadores inflamatórios no ambiente pode levar à lesão tecidual (DIXON et al., 2013; ATMADJA et al, 2002). A aquisição de diferentes fenótipos de macrófagos, M1 e M2 seguidas das suas heterogeneidades de funções, estão relacionados com a resposta hepática ocorrida na sepse (TACKE; KRENKEL, 2017).

Frente a esse panorama geral onde a sepse leva ao estímulo exacerbado da resposta imune inflamatória, mesmo não resultando em cura, mas levando à formação de lesão tecidual, o avanço em pesquisas para o tratamento de doenças inflamatórias vem se tornado bastante difundido. Diante desse cenário, e considerando a carência de estudos científicos utilizando extratos e compostos isolados de produtos naturais no tratamento da sepse, a utilização dos mesmos com fins terapêuticos, surge como um campo de pesquisa promissor (RAHMANI et al, 2018).

1.5. CURCUMINA

A curcumina é um polifenol derivado da raiz da *Curcuma longa L* amplamente utilizada na culinária (açafrão) e conhecida por seus efeitos antioxidantes relacionados a neutralização de danos celulares, anti-inflamatórios, antiproliferativos, imunomoduladores, neuroprotetores. (ZHAO et al, 2015; CHEN et al., 2018). Uma das limitações do seu uso na clínica é a sua baixa biodisponibilidade, possui baixa absorção em água e sofre metabolismo hepático de primeira passagem. Sua metabolização pode levar desde a conjugação com sulfato e ácido glicurônico até a formação de tetraidrocurcumina e hexaicurcuminol, a primeira referente a casos em que ela é administrada por via oral e a segunda por via intravenosa ou intraperitoneal (SANTIAGO et al., 2015).

Em estudos recentes, a curcumina foi capaz de reduzir a resposta inflamatória através da regulação de moléculas inflamatórias (SRIVASTAVA et al, 2011; GUPTA, et al 2012; MA et al., 2017). As propriedades contidas na curcumina são capazes de inibir a peroxidação lipídica, a indução da iNOS e a supressão da produção de superóxidos, como também reduzir a produção de mediadores inflamatórios (TNF α , IL-1 β e NFK- β) induzidos por LPS (ATMADJA et al, 2002; SAVCUN et al, 2013). Sabe-se que a sepse pode chegar há um estado de imunossupressão e os linfócitos Tregs desempenham um importante papel na manutenção da tolerância imunológica. Estudos mostram que o tratamento com curcumina aumentou a regulação de Tregs e a expressão do seu regulador Foxp3 (CHEN et al., 2018).

Por seus papéis benéficos na inflamação, a curcumina tem sido descrita no tratamento de várias doenças inflamatórias, incluindo na sepse (VACHHARAJANI et al, 2010). Estudos também comprovam que com o pré-tratamento ela foi capaz de prevenir lesão induzida por LPS no fígado através da redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, infiltrado polimorfonuclear e estresse oxidativo (KAUR et al, 2006; SAVCUN et al, 2013). O polifenol é um inibidor do fator nuclear AP-1 e da via NF-KB, ambos importantes para a ativação celular. A via NF-KB é responsável pela transcrição de DNA e pode ser encontrada em todos os tipos celulares. Possui papel importantíssimo na inflamação e a sua ação inibitória leva a redução de quimiocinas e citocinas envolvidas na resposta inflamatória, dessa forma, ela torna-se um alvo

molecular para estudos em doenças inflamatórias como a sepse (SANTIAGO et al., 2015).

A curcumina também é relatada na capacidade de regular a expressão de genes apoptóticos, abrindo também caminhos para estudos envolvendo morte celular (SANTIAGO et., 2015). Embora o estudo da curcumina no tratamento de doenças inflamatórias tenha crescido, as potenciais melhoras do uso da curcumina no tratamento da sepse e choque séptico ainda são escassas, em contrapartida os estudos mostram que ela é capaz de prevenir a evolução dos eventos ocorridos, e até o momento não foi descrito toxicidade no seu uso em humanos e animais, mesmo assim, não se sabe pontuar ainda com clareza quais seriam as restrições no seu uso (MEMIS D et al, 2008; SANTIAGO et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

A sepse é um problema de saúde pública mundial e, mesmo com os avanços da ciência e das tentativas de se elaborar definições esclarecedoras, ainda é difícil controlar sua evolução para a disfunção orgânica e, conseqüentemente os altos índices de mortalidade.

O fígado é um órgão de grande importância no controle de doenças inflamatórias como a sepse, pois possui um papel central na modulação da resposta imune devido a sua constituição celular e complexidade funcional. Dessa forma, a manutenção de sua integridade e funcionalidade, pode contribuir para uma melhora na resposta inflamatória e, o melhor prognóstico do paciente séptico. Neste contexto, a busca por opções terapêuticas alternativas que visam a redução do desequilíbrio da resposta pró-inflamatória na sepse é crescente, o que, teoricamente, poderia ser alcançado com uso de fitoterápicos com efeito anti-inflamatório comprovado em outras situações. A curcumina, extraída da *Curcuma Longa*, tem sido amplamente utilizada na medicina por seus vários efeitos anti-inflamatórios e cicatrizantes, tais como em casos de artrite, arteriosclerose, distúrbios respiratórios e gastrointestinais, além de seus efeitos hepatoprotetores.

Estudos experimentais com o uso da curcumina no modelo de CLP tem revelado informações importantes a respeito do efeito da curcumina na sepse em vários órgãos, inclusive no fígado. Isso colabora para que estudos mais aprofundados sejam realizados na tentativa de demonstrar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no efeito hepatoprotetor da curcumina na sepse. Portanto, estudos que envolvam tratamento com curcumina, avaliação da morfologia e funcionalidade hepática tornam-se necessários, para que se consiga prevenir o dano hepático, preservar as suas funções e gerar caminhos para uma melhor resposta do organismo frente ao insulto infeccioso.

Assim, a hipótese geral do presente trabalho consiste em verificar o efeito hepatoprotetor da curcumina no contexto da sepse experimental, o que mostra a importância desse estudo, pois o mesmo servirá como base para criar novas intervenções e estratégias para investigar como a curcumina modifica os parâmetros morfológicos e bioquímicos no processo de evolução da sepse.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da curcumina sobre a morfologia e funcionalidade hepática de animais submetidos à sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP).

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliação da sobrevivência dos animais submetidos à sepse, tratados e não tratados com curcumina.
2. Avaliação morfológica do tecido hepático dos animais submetidos à sepse, tratados e não tratados com curcumina.
3. Avaliação do depósito de glicogênio no fígado dos animais submetidos à sepse tratados e não tratados com curcumina.
4. Avaliação da função hepática dos animais submetidos à sepse, tratados e não tratados com curcumina.

4. MÉTODOS

4.1 Animais de Experimentação e Delineamento experimental - O presente projeto foi aprovado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás – UFG sob o protocolo 099/16, e foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo (CONCEA/MCTIC). O presente estudo foi realizado nas dependências do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG e, para tal, foram utilizados camundongos machos adultos, devido a sua melhor resposta e simulação orgânica em intervenções experimentais. A linhagem utilizada foi a C57Bl/6, com peso entre 22 e 25g, provenientes do Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP). Os animais foram mantidos em microisoladores e estantes ventiladas nas salas de experimentação do Biotério do IPTSP, onde receberam água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em 4 grupos (Grupo SHAM, SH+C; CLP; CLP+C) e subdivididos em 4 subgrupos de tempo de coleta de material biológico (24h, 48h, 72h e 120h) após indução de CLP. Os subgrupos de animais tiveram n=5 para SHAM e SHAM+CUR e para os subgrupos CLP e CLP+CUR tiveram n=7, pois houve repetição experimental do subgrupo.

- Grupo de animais falso operados (SHAM);
- Grupo de animais falso operados e tratados com curcumina (SHAM+C);
- Grupo de animais submetidos ao estímulo séptico grave (CLP);
- Grupo de animais submetidos ao estímulo séptico grave e tratados com curcumina (CLP+C).

4.2 Tratamento com curcumina - Os animais dos grupos não-tratados (SHAM e CLP) receberam 100µL/animal de solução salina por gavagem, duas horas antes e, a cada 12 horas após a indução da sepse ou da falsa cirurgia durante 5 dias consecutivos. Os animais dos grupos tratados com curcumina (SHAM+C e CLP+C) receberam, por gavagem, 100mg/kg de peso corporal de curcumina (Curcumin - Arcaro et al. 2014), diluída em 100µl de salina, duas horas antes e, a cada 12 horas após a indução da sepse ou da falsa cirurgia durante 5 dias consecutivos. Após o tratamento, os animais foram acondicionados novamente em suas gaiolas e inspecionados diariamente para verificar ocorrência de quaisquer complicações.

4.3 Indução de sepse pelo modelo CLP (*cecal ligation and puncture*) - Os animais foram anestesiados com solução de xilazina e cetamina (Xilazin, frasco-ampola contendo 200 mg/10mL, Syntec, Brasil) e (Cetamin, frasco-ampola contendo 100 mg/10mL, Syntec, Brasil), juntamente com a administração prévia analgesia com cloridrato de tramadol, (Cloridrato de Tramadol, frasco-ampola contendo 100 mg/ML, GERMED, Brasil), na proporção de 1:1 e na dose de 0,1 mL/100g de peso, correspondendo a 2 mg e 10 mg de cada droga, respectivamente, por via intraperitoneal. Posteriormente, foi realizada a laparotomia mediana com aproximadamente 1 cm de extensão. O ceco foi localizado, exposto e ligado a com linha de seda estéril, após este procedimento o mesmo foi perfurado duas vezes com agulha 18G para indução de estímulo séptico grave. O grupo de animais falso-operados foi submetido ao mesmo procedimento, porém sem a ligação e perfuração do ceco. Após o processo cirúrgico o ceco dos animais foi recolocado em sua posição original, dentro do abdômen, e o mesmo foi fechado em duas camadas. Imediatamente após a cirurgia cada animal recebeu uma injeção subcutânea de 1mL de solução salina e foi colocado em incubadora a 37°C por 1 hora. No pós-operatório os animais foram tratados com analgésico de ação central, cloridrato de tramadol (Tramal®) na dose de 0,05mg/m L de água nos bebedouros de cada gaiola (durante o período experimental de 24, 48, 72 e 120 horas).

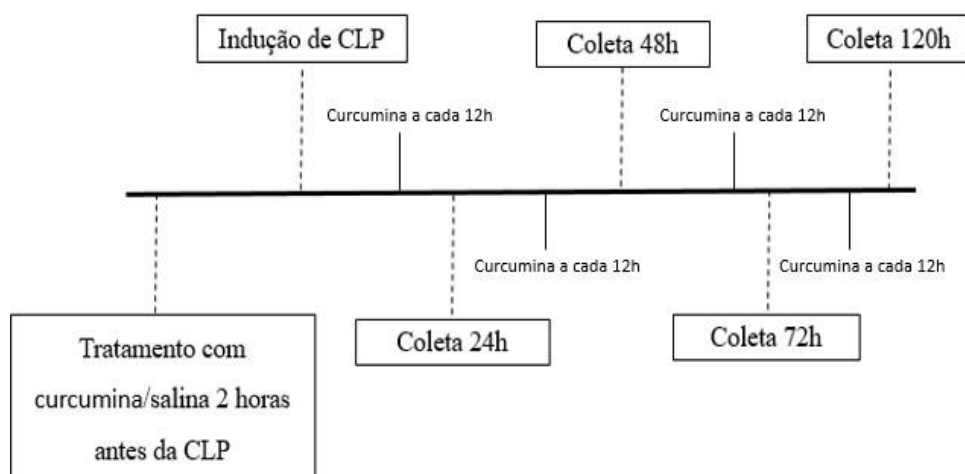


Figura 2: Representação esquemática dos períodos de tratamento e coleta antes e após o início da CLP.

4.4. Monitoramento do Estado Geral dos Animais: Todos os animais foram pesados antes e depois do procedimento de CLP, foram feitas também avaliações de parâmetros clínicos, como aparência geral do camundongo, alteração do peso, comportamento e temperatura para a confirmar a instalação do quadro nos animais submetidos a seps experimental (SHRUM et al., 2014).

QUADRO 1: Parâmetros clínicos gerais avaliados nos grupos de animais experimentais.

Parâmetro	Critério	Score
1- Aparência	Normal, pelos macios	Sim - Presença do critério ou Não - Ausência do critério
	Piloereção	
	Muco nos olhos	
2- Comportamento	Normal, ágil	
	Redução da mobilidade	
	Prostração	
	Atonia muscular	
3- CLP	Diarreia	

(Adaptado de: SHRUM et al., 2014)

4.5. Avaliação da sobrevida – A sobrevida dos animais foi avaliada a cada 12 horas, durante todo o período de experimentação. Foi estabelecido um prazo máximo de observação de 120 horas (5 dias).

4.6. Coleta e processamento do material para análise histológica - Após os períodos experimentais de 24, 48, 72 e 120 horas da indução de sepse por CLP, os animais de cada grupo (n= 6 animais por grupo) foram anestesiados com solução de xilazina e cetamina (Syntec, Brasil), na proporção de 1:1 e na dose de 0,1mL/100g de peso por via intraperitoneal para eutanásia. Em seguida, o fígado foi rapidamente excisado, lavado em solução salina à 4°C, seco em papel filtro, pesado em balança de precisão e clivado para processamento. Uma parte do tecido foi fixada em formol 10% para histologia convencional. A outra parte foi congelada a -80°C para os experimentos de dosagem de citocinas (ELISA). Após o período de fixação do material em formol, foi realizado o processo de desidratação dos tecidos em concentrações crescentes de álcool 70%, 90% e 100% (1 hora em cada). Após o último álcool, as amostras foram clarificadas em xilol (1 hora em cada), três banhos em parafina (o primeiro de 30 minutos e os dois últimos de 45 minutos cada) e incluídas em parafina. Cada bloco de parafina foi cortado em fatias de cerca de 5 µm de espessura em micrótomo rotativo semiautomático e, posteriormente, corados com hematoxilina e eosina (HE), ou ácido periódico de Schiff (PAS) para análise histológica.

4.7. Análise histopatológica de HE – Foi avaliada alterações de esteatose, congestão, alteração da relação núcleo/citoplasma, balonização dos hepatócitos, duplicação de núcleo e alteração da arquitetura tecidual ocorridas durante a sepse. A avaliação das lâminas foi feita de forma qualitativa por um único avaliador em 20 campos aleatórios, no aumento de 400x. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se o microscópio Leica MD, acoplado a um microcomputador.

QUADRO 2: Parâmetros e escores utilizados na avaliação de HE.

Escores	Esteatose, congestão, balonização, duplicação de núcleo, alterações da relação núcleo/citoplasma e arquitetura tecidual
0	Ausência de alteração
1	Discreto – alteração de 1 a 25% do tecido
2	Moderado – alteração de 26% a 50% do tecido
3	Acentuado – alteração acima de 51 % do tecido

(Adaptado de: FABIANI et al., 2017).

4.8. Análise histopatológica de PAS – Na coloração de PAS foi avaliada a marcação de glicogênio, considerada positiva as áreas na cor rosa púrpura a magenta no citoplasma dos hepatócitos. A avaliação foi realizada de forma quantitativa por um único avaliador em 20 campos aleatórios no aumento de 10x. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se o microscópio Leica MD, acoplado a um microcomputador.

QUADRO 3: Escores utilizados na avaliação de PAS.

Avaliação da marcação de glicogênio	
0	Rara – de 0 a 10 % do tecido
1	Discreta – presença de 11 a 30 % do tecido
2	Moderada – presença de 31 a 70 % do tecido
3	Acentuada – acima de 71 % do tecido

(Adaptado de: PONIKAU et al., 2003).

4.9 Avaliação da função hepática (bioquímica sérica) - Após a anestesia dos camundongos com solução de xilazina e cetamina (Syntec, Brasil), na proporção de 1:1 e na dose de 0,1mL/100g de peso por via intraperitoneal, o sangue dos animais foi coletado sem anticoagulantes e com gel separador de coágulo (500µL) (Labor import, Cral, Cotia, São Paulo), deixados em repouso, a temperatura ambiente (25°C), por 30 minutos e após centrifugados por 10 minutos a 3800 rotações por minuto para obtenção

do soro. Em seguida, o soro obtido foi alíquotado, identificado e acondicionado em freezer – 80°C até o momento da análise. Foram analisadas as concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteínas totais, albumina e globulina, para avaliação da função hepática. As dosagens dos parâmetros bioquímicos, acima mencionados, foram realizadas para os tempos 24 e 120 horas após a indução da sepse com o auxílio de *kits* reagentes comerciais, através de leituras cinética, colorimétrica e espectrofotométrica.

4.10 Análise estatística - Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism8. Foi aplicado o teste de D'Agostino para verificar se os dados obtidos apresentaram distribuição normal. Os níveis de significância considerados foram de 5% e os dados apresentados como média \pm desvio padrão (SD). As comparações múltiplas entre os grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Os gráficos de sobrevivência foram construídos utilizando-se a Curva de Kaplan-Meier e as diferenças estatísticas analisadas utilizando o *Logrank test*.

5.1.2 Avaliação qualitativa dos parâmetros clínicos

Foi avaliadas alterações físicas que indicavam presença de um quadro séptico (Quadro 2), as observações foram iniciadas seis horas após a CLP. Os grupos CLP e CLP+CUR apresentaram presença de alterações de aparência: piloereção e secreção ocular. Comportamento: redução da mobilidade, prostração e atonia muscular. Presença de diarreia: característica que indica instalação de um quadro séptico.

QUADRO 4: Avaliação clínica do estado geral dos animais.

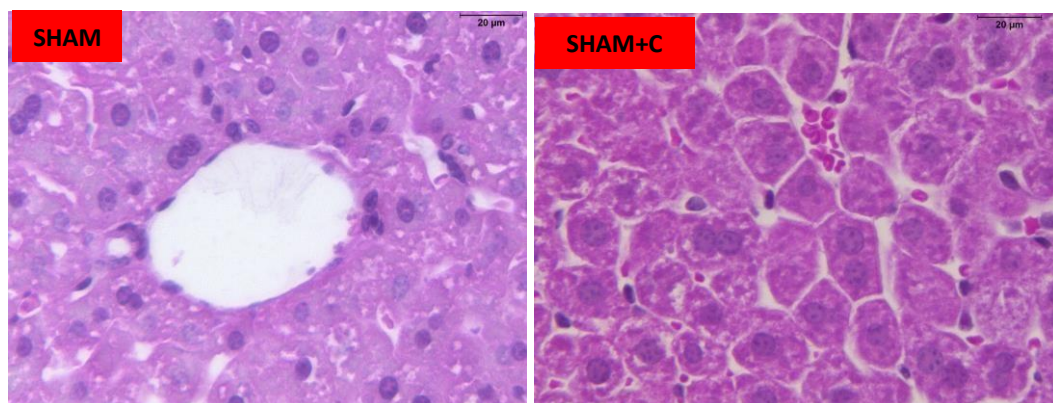
Grupo	Piloereção	Diarreia	Redução da mobilidade	Atonia muscular	Prostração	Secreção ocular
SHAM	Não	Não	Não	Não	Não	Não
SHAM+CUR	Não	Não	Não	Não	Não	Não
CLP	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
CLP+CUR	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

5.2 Morfologia Hepática

5.2.1 Avaliação das alterações na arquitetura tecidual.

Os animais dos grupos SHAM+CUR e SHAM apresentaram integridade celular e tecidual, com ausência de lesão em todos os tempos experimentais. Nos subgrupos CLP + CUR e CLP 24h foi observado esteatose microvesicular discreta e multifocal no citoplasma dos hepatócitos. Apresentaram congestão moderada e multifocal nos sinusóides e no espaço porta. Foram observados núcleos com variação de tamanho e tumefação celular. Notou-se balonização dos hepatócitos moderada e multifocal. Foi observado duplicação de núcleo de hepatócitos discreta e multifocal. A arquitetura tecidual apresentou-se de forma íntegra, com lóbulos e cordões de hepatócitos com aspecto tecidual normal (Figura 4).

Nos subgrupos CLP+CUR e CLP 48h apresentaram esteatose microvesicular discreta no citoplasma dos hepatócitos, multifocal em CLP+CUR e difusa em CLP no mesmo tempo. Apresentaram congestão moderada e multifocal nos sinusóides e no espaço porta. A relação núcleo/citoplasma apresentou-se alterada. Foi observado núcleos com variação de tamanho e tumefação celular moderada e multifocal no subgrupo CLP + CUR 48h, e moderada e difusa no subgrupo CLP 48h, destacando o efeito da curcumina no metabolismo e integridade celular. Notou-se balonização dos hepatócitos moderada e multifocal. Foi observado duplicação de núcleo de hepatócitos discreta e multifocal. A arquitetura tecidual apresentou-se de forma íntegra, com lóbulose cordões de hepatócitos com aspecto tecidual normal (Figura 4).



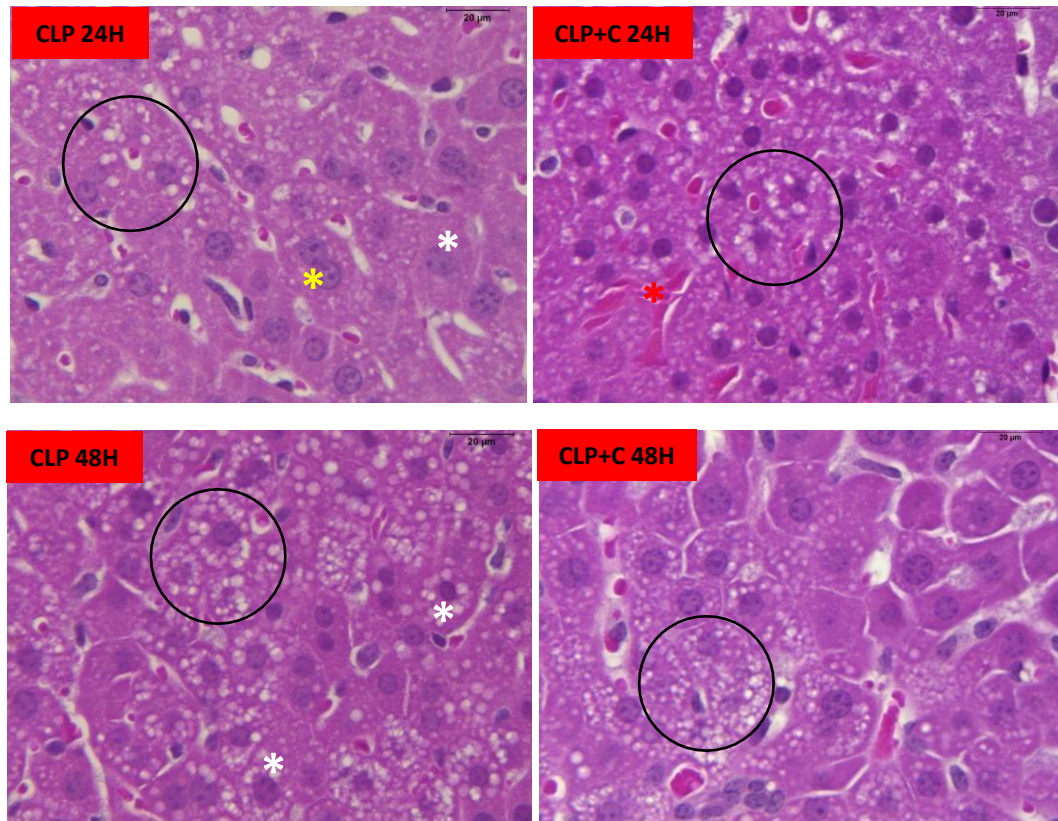


Figura 4: Pannel de fotomicrografias dos cordões de hepatócitos de camundongos C57/BL6 do grupo SHAM, SHAM+CUR (HE 10x e 40x), CLP e CLP+CUR 24-48h (HE 40x). SHAM e SHAM+CUR, representativa dos tempos 24h-120h, com ausência de alterações histopatológicas. Subgrupo CLP e CLP+CUR 24h (HE, 400x) com esteatose microvesicular discreta e multifocal (círculo), balonização dos hepatócitos e tumefação celular (* branco), e duplicação de núcleo (* amarelo). Subgrupo CLP e CLP+CUR 48h com esteatose microvesicular discreta e multifocal em CLP+CUR, e discreta e difusa em CLP 48h (círculo). Congestão (*vermelho).

Em CLP+CUR e CLP 72h foi observado esteatose microvesicular moderada e discreta em CLP+CUR, e moderada e multifocal em CLP no citoplasma dos hepatócitos, evidenciando o efeito da curcumina sobre o grau de acometimento da esteatose. Os dois subgrupos apresentaram congestão moderada e multifocal nos sinusóides e no espaço porta. A relação núcleo/citoplasma apresentou-se alterada, foi observado núcleos com variação de tamanho e tumefação celular. Notou-se balonização dos hepatócitos moderada e multifocal. Foi observado duplicação de núcleo de hepatócitos discreta e multifocal. Os cordões de hepatócitos perderam discretamente a sua delimitação e continuidade, apresentaram-se discretamente disformes e com distribuição multifocal (Figura 5).

Nos subgrupos CLP+CUR e CLP 120h não foi observado presença de esteatose. Apresentaram congestão moderada e multifocal nos sinusóides e no espaço porta. A

relação núcleo/citoplasma apresentou-se alterada, foi observado núcleos com variação de tamanho e tumefação celular. Notou-se balonização dos hepatócitos moderada e multifocal. Foi observado duplicação de núcleo de hepatócitos discreta e multifocal. Os cordões de hepatócitos também perderam discretamente a sua delimitação e continuidade, apresentaram-se discretamente disformes e com distribuição multifocal (Figura 5).

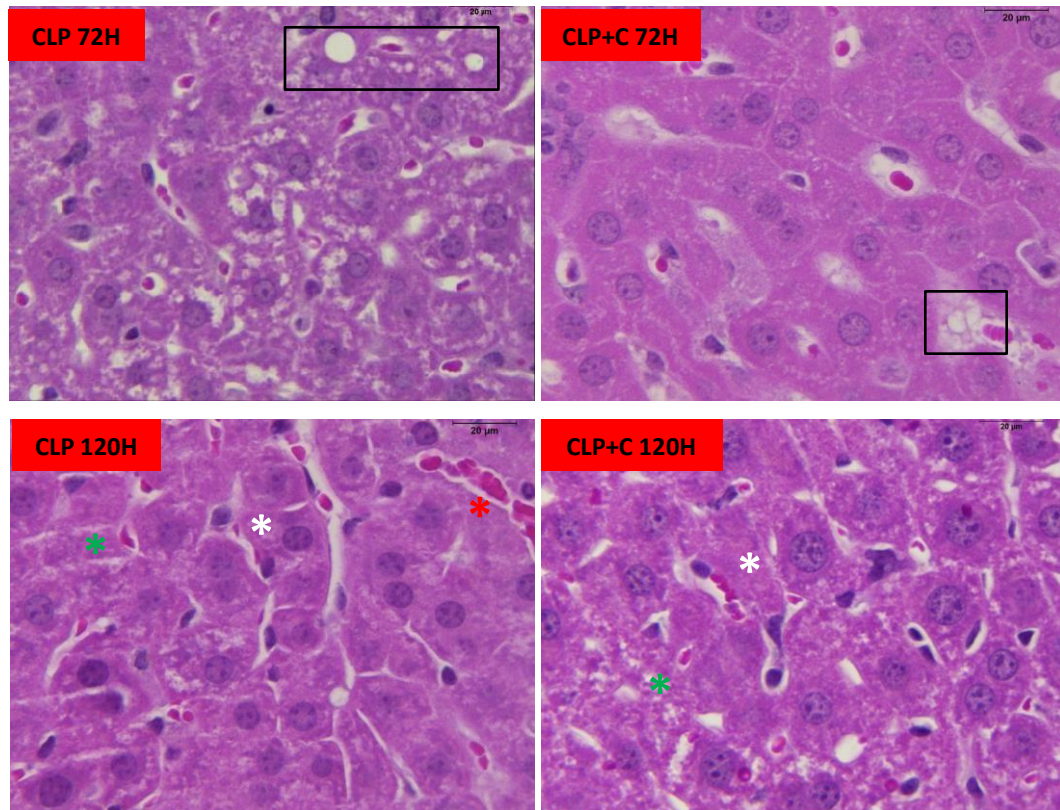


Figura 5: Painele de fotomicrografias dos cordões de hepatócitos de camundongos C57/BL6 do subgrupo CLP e CLP+CUR 72h e 120h (HE, 400x). Apresentando esteatose microvesicular moderada e multifocal em CLP 72h (retângulo) e em CLP+CUR 72h discreta e multifocal (retângulo). Balonização dos hepatócitos e tumefação celular (* branco). Congestão (*vermelho). Alteração nos cordões de hepatócitos, perderam discretamente a sua delimitação e continuidade, estão discretamente disformes e com distribuição multifocal (*verde).

TABELA 1: Valores dos escores avaliados nos parâmetros dos subgrupos CLP e CLP+CUR.

Grupos	Esteatose	Alteração da relação N/C	Balonização celular	Duplicação de núcleo	Alteração na arquitetura tecidual	Congestão
CLP 24h	1	2	2	1	0	2
CLP+CUR 24h	1	2	2	1	0	2
CLP 48h	2	2	2	1	0	2
CLP+CUR 48h	1	2	2	1	0	2
CLP 72h	2	2	2	1	1	2
CLP+CUR 72h	1	2	2	1	1	2
CLP 120h	0	2	2	1	2	2
CLP+CUR 120h	0	2	2	1	1	1

5.2.2 Avaliação por escore de glicogênio PAS-positivo

Na avaliação por escore de glicogênio PAS-positivo os subgrupos SHAM e SHAM+ CUR não apresentaram alteração na produção de glicogênio durante todo o período experimental. Entretanto, foi possível observar que em 24h a produção de glicogênio em grupos CLP+CUR e CLP, permaneceram próximos entre si. Em 48h o subgrupo tratado aumentou significativamente em relação ao subgrupo CLP 48h. Em 72h o subgrupo CLP+CUR reduziu significativamente em relação ao subgrupo CLP72h, evidenciando o efeito da curcumina na síntese de glicogênio pelo fígado nesse período. (Figura 6).

O subgrupo CLP+CUR 72h aumentou significativamente em relação a SHAM+CUR 72h e CLP 72h em relação a SHAM 72h, pontuando que neste tempo após a sepse há um aumento da síntese de glicogênio em relação aos animais não sépticos. (Figura 6). Em 120h o subgrupo CLP+CUR também reduziu significativamente em relação a CLP 120h, observando também nesse tempo o efeito da curcumina sobre o estado da reserva energética de glicogênio na sepse. Outro dado importante foi que em 48h o subgrupo CLP+CUR aumentou significativamente em relação ao subgrupo CLP+CUR 120h, refletindo que a curcumina possui um papel redutor na síntese de glicogênio após o período de 48 horas (Figura 6).

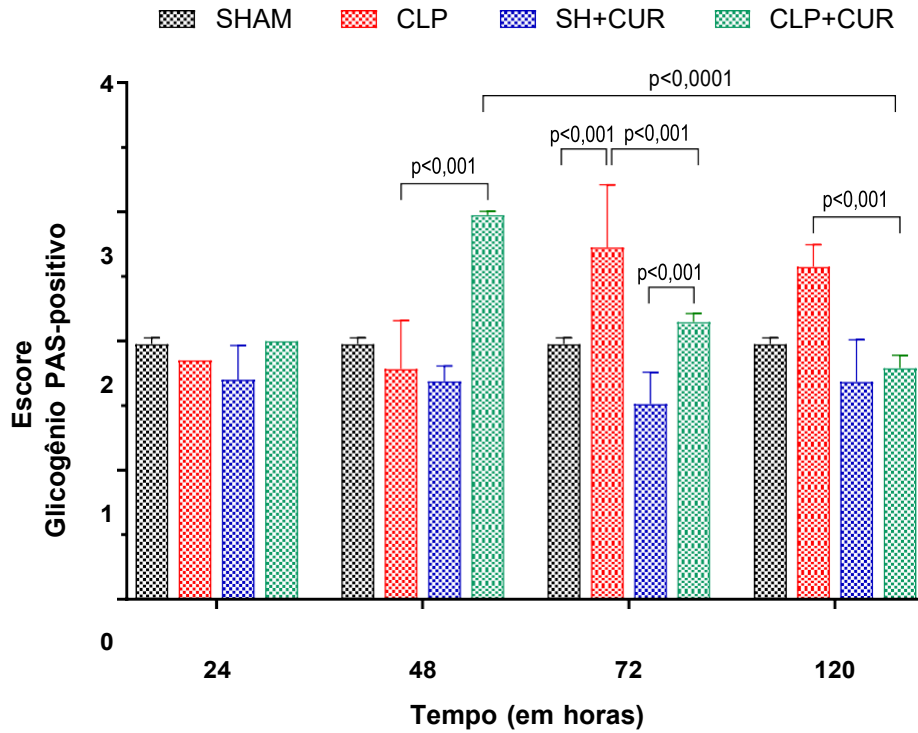
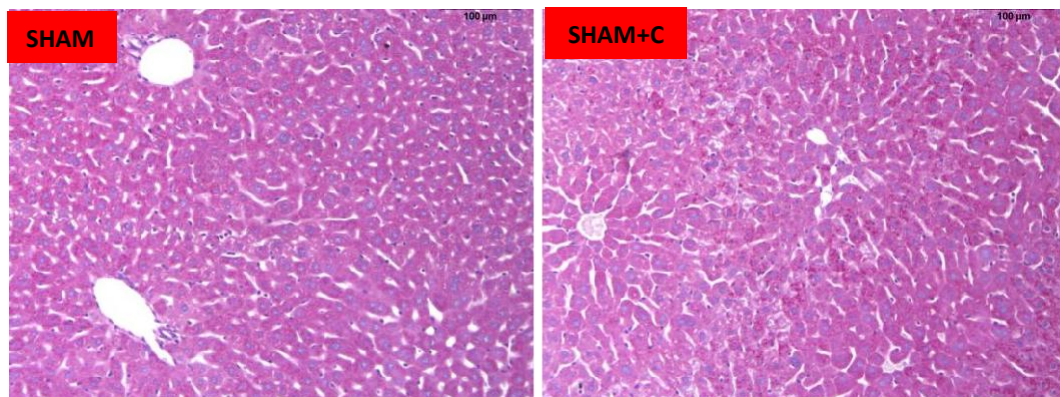


Figura 6 : Gráfico dos valores de escore de glicogênio PAS-positivo por tempo (horas).

5.2.3 Avaliação histopatológica de glicogênio PAS-positivo

Foi possível observar marcação positiva em todo o tecido nos subgrupos SHAM e SHAM+CUR (Figura 7). Em 24h a marcação foi positiva em somente algumas regiões das zonas 1 e 2 do tecido, nos subgrupos CLP+CUR e CLP. (Figura 7). No tempo de 48h foi possível verificar um aumento da marcação nas zonas 1, 2 e 3 em CLP+CUR, por todo o tecido, em comparação ao subgrupo CLP que obteve marcação positiva nas zonas 1, 2 e 3, em algumas regiões do tecido hepático (Figura 7).



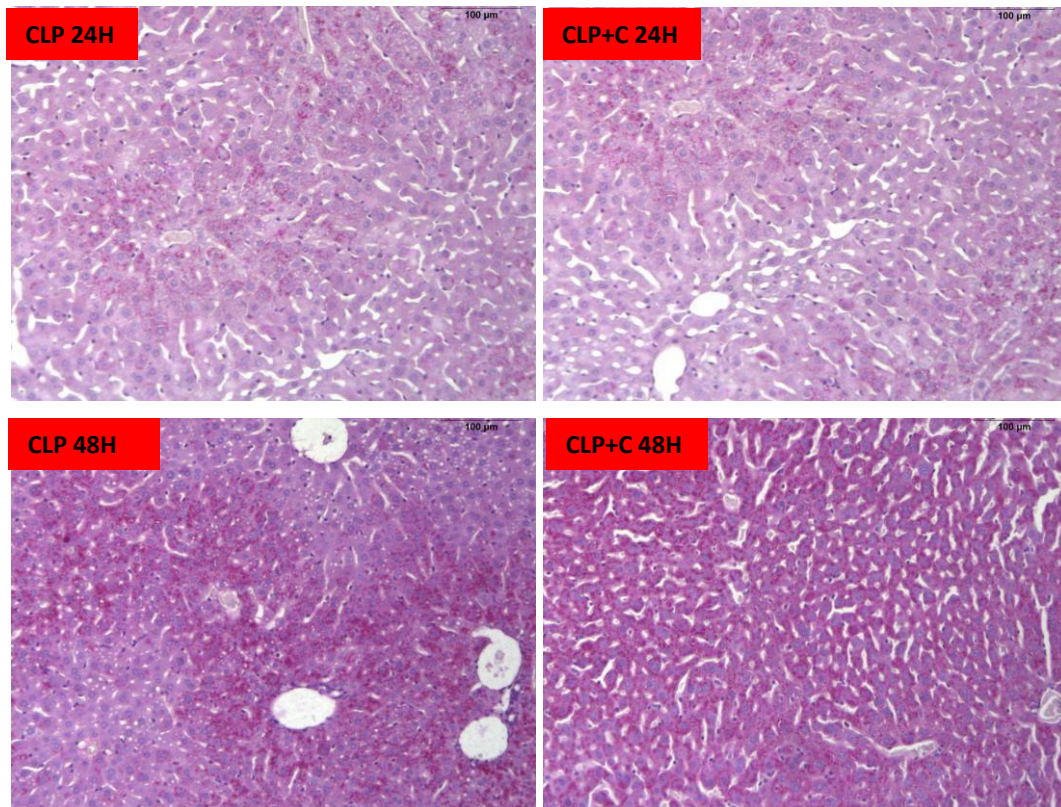
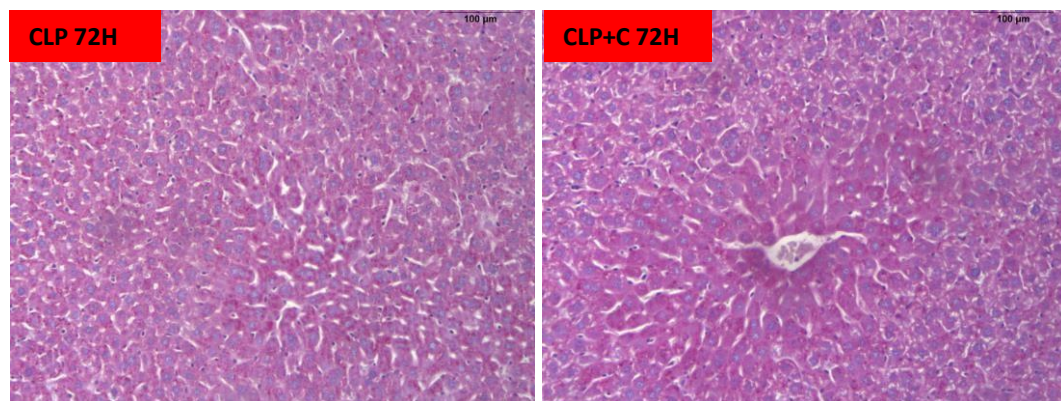


Figura 7: Painele de fotomicrografias dos cordões de hepatócitos de camundongos C57/BL6 com marcação positiva de glicogênio rosa púrpura a magenta, dos subgrupos SHAM, SHAM+CUR, CLP e CLP+CUR 24h e 48h (PAS, 10x). SHAM e SHAM+CUR (representativa de todos os tempos), CLP e CLP+CUR 24h e 48h, com marcação positiva no citoplasma dos hepatócitos em todos os tempos.

Já nos tempos de 72h e 120h os subgrupos CLP+CUR obtiveram grau de marcação positiva nas zonas 1 e 2, em algumas regiões do tecido, sendo ela inferior as marcações do CLP 72h e 120h, respectivamente, positivas nas zonas 2 e 3, por todo o tecido. (Figura 8).



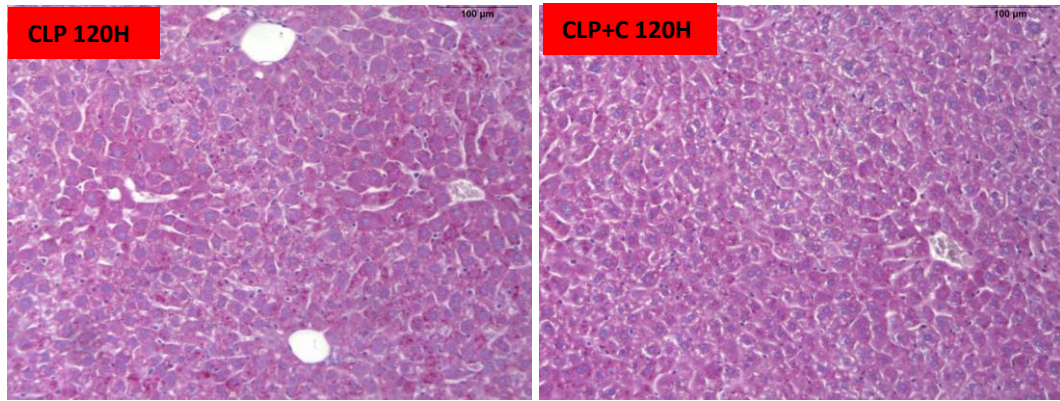


Figura 8: Pannel de fotomicrografias dos cordões de hepatócitos de camundongos C57/BL6 com marcação positiva de glicogênio rosa púrpura a magenta, dos hepatócitos nos subgrupos CLP e CLP+CUR 72h e 120h (PAS, 10x). CLP e CLP+ CUR com marcação positiva no citoplasma dos hepatócitos.

5.3 Avaliação da lesão hepática

5.3.1 Avaliação da integridade celular: ALT, AST e Relação AST/ALT

Os resultados mostraram que ALT do subgrupo CLP 24h aumentou significativamente em relação aos grupos SHAM. Após 120h, os níveis de ALT no soro dos animais do grupo CLP apresentou redução significativa em relação ao subgrupo CLP 24h. (Figura 9). Os animais do Grupo CLP+CUR 24h apresentaram níveis reduzidos de ALT quando comparados ao grupo CLP 24h, entretanto, essa diferença não foi significativa.

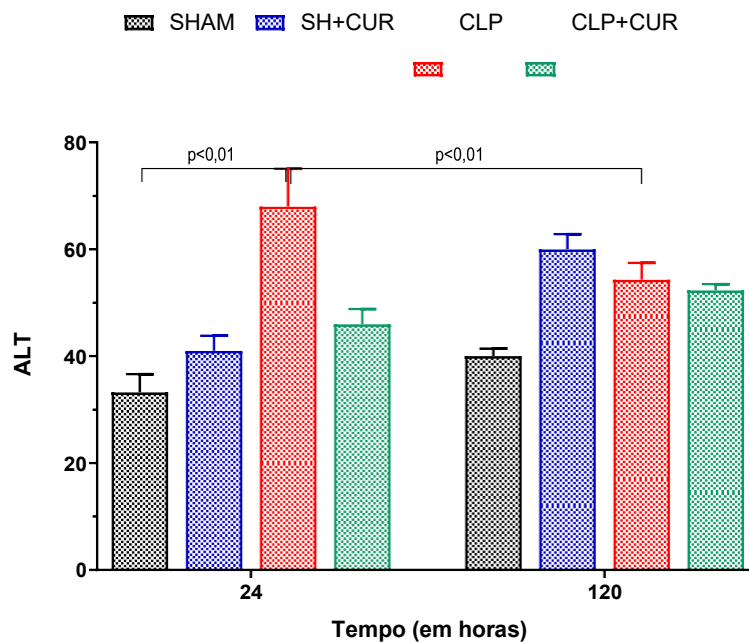


Figura 9: Gráfico do valor de ALT (UA) por tempo (horas). Animais falso operados (SHAM), falso operados e tratados (SHAM+CUR), submetidos à cirurgia (CLP) e submetidos à cirurgia e tratados (CLP+CUR) (n= 100 animais). CLP 24h vs SHAM 24h e CLP 24h vs CLP 120h, $p < 0,01$, ANOVA).

Os níveis de AST foram avaliados 24h e 120h após a indução da sepse ou da falsa cirurgia em animais tratados e não tratados com curcumina. Os resultados mostraram que os níveis de AST aumentaram significativamente nos grupos CLP+CUR, do período de 24 para 120 horas e que o mesmo resultado foi observado nos animais do grupo CLP (Figura 10).

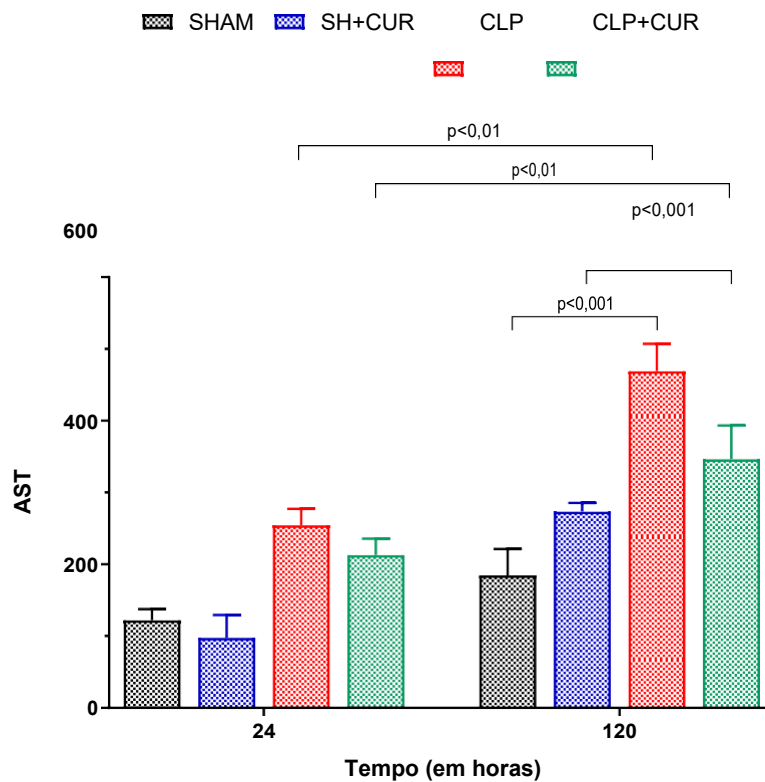


Figura 10 : Gráfico do valor de AST (UA) por tempo (horas). Animais falso operados (SHAM), falso operados e tratados (SHAM+CUR), submetidos à cirurgia (CLP) e submetidos à cirurgia e tratados (CLP+CUR) (n= 100 animais). CLP 24h vs CLP 120h, CLP+CUR 24h vs CLP+CUR 120h, SHAM 120h vs CLP 120h, e SHAM 120h vs CLP+CUR 120h, $p < 0,01$, ANOVA).

Na relação AST/ALT a curcumina reduziu o dano hepático em CLP+CUR 120h em relação a CLP 120h. Nos grupos CLP+CUR 24h a curcumina reduziu pouco em relação a CLP 24h. Nos grupos CLP+CUR 24h e 120h a relação AST/ALT se manteve proporcional. Em CLP 24h e 120h a relação aumentou em comparação aos grupos SHAM 24h e 120h. (Figura 11).

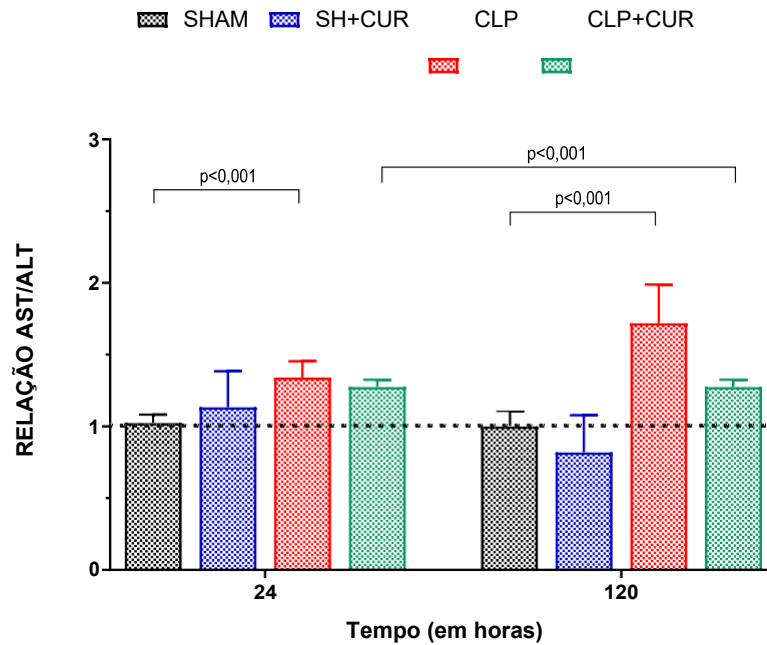


Figura 11: Gráfico do valor de AST/ALT (UA) por tempo (horas). Animais falso operados (SHAM), falso operados e tratados (SHAM+CUR), submetidos à cirurgia (CLP) e submetidos à cirurgia e tratados (CLP+CUR) (n= 100 animais). SHAM 24h vs CLP 24h, CLP+CUR 24h vs CLP+CUR 120h, SHAM 120h vs CLP 120h, $p < 0,001$, ANOVA.

5.3.2 Avaliação da síntese hepática: Proteínas totais, albumina e Relação albumina/globulina

Através da avaliação de proteínas totais foi possível inferir que no tempo de 24h o subgrupo CLP+CUR aumentou em relação a CLP. Houve aumento significativo no valor de proteínas no subgrupo CLP+CUR 24h em relação a CLP+CUR 120h. Foi possível notar também que o subgrupo CLP 120h aumentou em relação a SHAM 120h, e CLP+CUR 120h em relação a SHAM+CUR 120h (Figura 12).

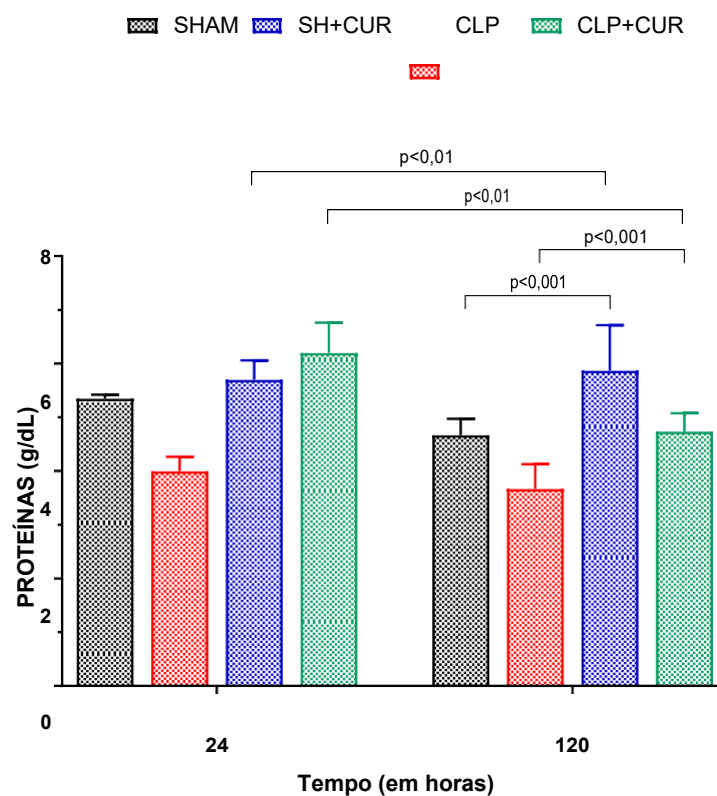


Figura 12: Gráfico do valor proteínas totais (g/dL) por tempo (horas). Animais falso operados (SHAM), falso operados e tratados (SHAM+CUR), submetidos à cirurgia (CLP) e submetidos à cirurgia e tratados (CLP+CUR) (n= 100 animais). SHAM+CUR 24h vs SHAM+CUR 120h ($p < 0,01$), SHAM+CUR 24h vs SHAM+CUR 120h ($p < 0,01$), SHAM 120h vs SHAM+CUR 120h ($p < 0,001$) e CLP 120h vs CLP+CUR 120h ($p < 0,001$).

Pela análise de albumina observou-se aumento da produção de albumina no subgrupo CLP+CUR 24h em relação a CLP 24h. O subgrupo CLP+CUR 24h teve aumento significativo em relação ao mesmo grupo e tempo, inferindo uma melhor produção de albumina no subgrupo tratado em 24h. Em relação ao subgrupo CLP 24h e 120h, teve redução significativa em relação ao SHAM 24h e 120h. (Figura 13).

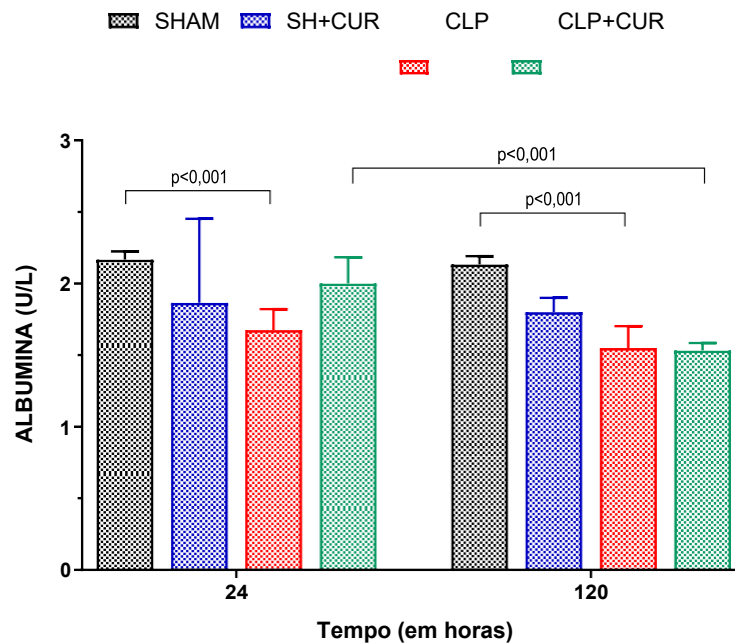


Figura 13: Gráfico do valor de albumina (U/L) por tempo (horas). Animais falso operados (SHAM), falso operados e tratados (SHAM+CUR), submetidos à cirurgia (CLP) e submetidos à cirurgia e tratados (CLP+CUR) (n= 100 animais). SHAM 24h vs CLP 24h ($p < 0,001$). CLP+CUR 24h vs CLP+CUR 120h ($p < 0,001$) e SHAM 120h vs CLP 120h ($p < 0,001$).

Na relação albumina/globulina nos grupos experimentais foi possível observar que a proporção aumenta nos subgrupos CLP+CUR 24h e 120h em relação a CLP 24h e 120h. No subgrupo CLP+CUR 24h a relação aumentou significativamente em relação a CLP+CUR 120h. No subgrupo CLP 24h e 120h a inflamação aumenta significativamente em relação a SHAM 24h e 120h. (Figura 14).

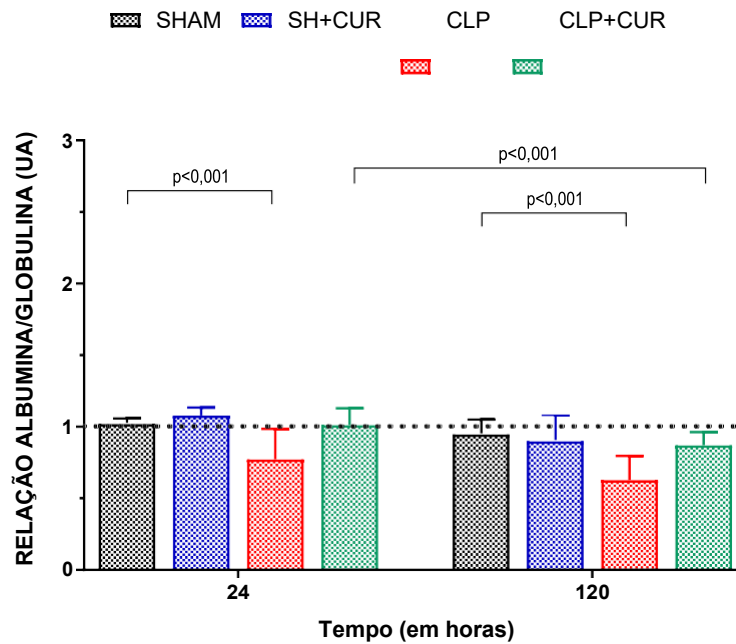


Figura 14: Gráfico da relação albumina/globulina (UA) por tempo (horas). Animais falso operados (SHAM), falso operados e tratados (SHAM+CUR), submetidos à cirurgia (CLP) e submetidos à cirurgia e tratados (CLP+CUR) (n= 100 animais). SHAM 24h vs CLP 24h ($p > 0,001$), CLP+CUR 24h vs CLP+CUR 120h ($p < 0,001$) e SHAM 120h vs CLP 120h ($p < 0,001$).

6. DISCUSSÃO

Durante a sepse a resposta imune se apresenta de forma desregulada com produção excessiva de mediadores inflamatórios, com a progressão da doença isso leva a disfunção orgânica de alguns principais órgãos: coração, cérebro, fígado e rim. O fígado sofre maior comprometimento em uma fase mais tardia da sepse e pode afetar outros órgãos devido a sua importância nas respostas imunes frente a processos inflamatórios (HENKIN CS et al, 2009).

Para verificação do quadro séptico nos animais experimentais, foi observado alguns parâmetros clínicos após 12 horas de indução de sepse, tempo esse de maior certeza em que a chance de um quadro séptico estaria instalada, descartando alguma variável no procedimento cirúrgico que pudesse interferir na avaliação, como o estresse animal. Dessa forma, verificou-se um quadro séptico nos animais que sofreram propriamente o procedimento cirúrgico de CLP através dos parâmetros clínicos avaliados.

Pelos resultados morfológicos de HE, foi visto que em 24h a curcumina não foi capaz de reduzir qualquer alteração histopatológica, permanecendo o grau de alteração celular e tecidual semelhante nos dois subgrupos CLP e CLP+CUR. Em 48h a curcumina no subgrupo CLP altera quantitativamente a formação vesicular na esteatose em relação a CLP. Notou-se que a curcumina altera a variação da relação celular núcleo/citoplasma, sendo observada em menor quantidade no subgrupo tratado em relação a CLP. Em 72h já foi possível observar um efeito da curcumina na formação vesicular e grau de acometimento da esteatose, o subgrupo CLP+CUR apresentou-se com um grau de esteatose menor em relação a CLP. Em 120h a esteatose não é vista, verificando que após 72h a alteração no metabolismo lipídico da sepse é revertida. Em relação a integridade tecidual, não foi possível observar que a curcumina possui um efeito notável na normalização da integridade hepática na sepse em 72h e 120h.

Para a compreensão da sepse e a sua relação com a disfunção orgânica, parâmetros clínicos, bioquímicos e fisiológicos são importantes a serem avaliados, todavia a análise histopatológica deve ser realizada em conjunto para o melhor entendimento da disfunção orgânica ocorrida na sepse (GAROFALO et al, 2019). Em estudos com animais a inflamação e a esteatose são duas alterações histopatológicas comumente encontradas na sepse em humanos, dados da literatura mostram que a

esteatose foi moderada a grave e observada em cerca de 40-80% do parênquima hepático. (GAROFALO et al, 2019; NESSELER et al, 2012).

No fígado a disfunção hepática pode ocorrer no início da sepse, cerca de 1,5 horas após CLP, e dados mostram que o constante processo inflamatório e a hipoperfusão, levam principalmente a esse evento. (YAN et al, 2015). A disfunção hepática é uma etapa posterior a ativação da resposta inflamatória ocorrida na sepse e dados da literatura mostraram que após 8h de indução de sepse as enzimas ALT e AST aumentaram significativamente em relação a normalidade (LI et al, 2018).

Os resultados mostraram que ALT do subgrupo CLP+CUR 24h reduziu em relação ao subgrupo CLP 24h, indicando o efeito da curcumina na redução de lesão hepática aguda nesse mesmo tempo, chegando próximo aos valores de ALT em SHAM e SHAM+CUR. Verificou-se também que o subgrupo CLP 24h teve aumento significativo em relação aos grupos SHAM e SHAM+CUR 24h, indicando lesão hepática nesse tempo. Em 120h CLP sofreu redução significativa em relação ao subgrupo CLP 120h, notando o aumento da enzima ALT especificamente no início da sepse. (Figura 9).

Em 24h e 120h foi observado que no subgrupo CLP+CUR, AST reduziu em relação a CLP, notando novamente o efeito da curcumina. Em 120h foi possível observar que CLP teve aumento significativo em relação ao subgrupo SHAM 120h e CLP 24h, o primeiro indicando o seu aumento devido a sepse e o segundo ao aumentada enzima propriamente em lesões crônicas inespecíficas do fígado. Em relação aos grupos tratados CLP em 24h e 120h, os resultados de AST em 120h aumentaram em relação ao tempo de 24h, indicando um efeito proporcional da curcumina sobre a sepse. (Figura 10).

Na relação AST/ALT notou-se que nos grupos CLP tratados houve redução da relação, principalmente no tempo de 120h, pontuando o efeito da curcumina principalmente em 120h. Foi possível observar que CLP 120h aumentou significativamente em relação a SHAM em 120h. Em 120h o subgrupo CLP também aumentou significativamente em relação a SHAM, demonstrando a ocorrência de dano hepático nos dois tempos, sobretudo em 120h.

Por meio das avaliações deste trabalho, as enzimas ALT, sendo essa específica para lesão aguda hepática e AST para lesões extra-hepáticas e tardias. O subgrupo CLP+CUR 24h obteve redução de ALT em relação ao subgrupo CLP no mesmo tempo, mostrando que a curcumina consegue interferir positivamente nas lesões iniciais da

sepsis. Na análise de AST, no subgrupo CLP+CUR 120h houve redução em relação a CLP 120h, confirmando a real característica do comportamento da enzima AST frente a um processo inflamatório e a redução da ocorrência de lesões extra-hepáticas tardias na sepsis.

A relação AST/ALT denominada relação de Ritis, indica o grau de dano hepático, sendo valores menores que 1 (lesão hepática leve) e valores maiores que 1 (lesão hepática grave) (TIETZ, 2008). Foi observado que a relação se reduz principalmente no subgrupo CLP+CUR 120h em relação a CLP 120h, sendo possível afirmar a influência benéfica da curcumina na prevenção de lesão hepática e consequentemente no dano hepático, sobretudo em 120h.

Através da avaliação de proteínas totais foi possível inferir que no tempo de 24h o subgrupo CLP+CUR aumentou em relação a CLP, verificando o efeito da curcumina na síntese de proteínas nesse tempo. Houve aumento significativo no valor de proteínas no subgrupo CLP+CUR 24h em relação a CLP+CUR 120h, destacando a maior síntese com o tratamento no tempo de 24h. Foi possível notar também que o subgrupo CLP 120h aumentou em relação a SHAM 120h, e CLP+CUR 120h em relação a SHAM+CUR 120h.

Pela análise de albumina observou-se aumento da produção de albumina no subgrupo CLP+CUR 24h em relação a CLP 24h, notando o efeito da curcumina nesse tempo. O subgrupo CLP+CUR 24h teve aumento significativo em relação ao mesmo grupo e tempo, inferindo uma melhor produção de albumina no subgrupo tratado em 24h. Em relação ao subgrupo CLP 24h e 120h, teve redução significativa em relação ao SHAM 24h e 120h, notando a menor produção de albumina em animais submetidos a sepsis.

Na relação albumina/globulina nos grupos experimentais foi possível observar que a proporção aumenta nos subgrupos CLP+CUR 24h e 120h em relação a CLP 24h e 120h, verificando o efeito da curcumina na redução da inflamação na sepsis. No subgrupo CLP+CUR 24h a relação aumentou significativamente em relação a CLP+CUR 120h, observando o melhor efeito da curcumina na redução da inflamação no tempo de 24h. No subgrupo CLP 24h e 120h a inflamação aumenta significativamente em relação a SHAM 24h e 120h, indicando processo inflamatório no subgrupo CLP.

O efeito benéfico da curcumina na síntese hepática foi observado na avaliação de proteínas totais, albumina e albumina/globulina, visto que ela foi capaz de aumentar

a síntese de proteínas totais em 24h e 120h, e de albumina em 24h nos animais sépticos. Para a relação albumina/globulina, foi indicativa de aumento de inflamação para valores menores que 1, e para valores maiores que 1, baixa resposta inflamatória. Notou-se que nos subgrupos CLP+CUR 24h e 120h, a relação aumentou em comparação aos subgrupos CLP, respectivamente, inferindo o efeito redutor da curcumina no processo inflamatório durante a sepse.

Na avaliação da marcação de PAS glicogênio-positivo, a curcumina em 24h sobre o grupo CLP não teve efeito, já em comparação aos tempos 72h e 120h, a curcumina consegue contribuir para a redução da síntese de glicogênio de forma a normalizar essa produção. Em conjunto com a literatura, dados mostram que na sepse há uma variação nos níveis de glicemia e isso é um componente de gravidade em pacientes sépticos, dessa forma, avaliar os níveis de glicogênio durante a sepse auxilia na avaliação da gravidade que o paciente se encontra (LEVY, 2006). A resposta para a gliconeogênese e para a síntese de proteínas de fase aguda advém dos aminoácidos gliconeogênicos produzidos na degradação muscular (CAPPI; SORIANO, 2010).

O balanço geral energético na sepse sofre variações, encontra-se uma rápida fase hiperglicêmica inicial em consequência da utilização das reservas de glicogênio, com pouca gliconeogênese; acompanhada de hipoglicemia intensa nos estágios tardios da sepse. Os resultados mostraram que a curcumina consegue alterar de forma contrária as variações dos níveis de glicogênio, ou seja, ela tende a aumentar as reservas de glicogênio em CLP 24h e 48h, principalmente em 48h em comparação aos grupos CLP no mesmo tempo. O tratamento com curcumina pode prevenir o desbalanço das reservas de glicogênio em estágios mais tardios da sepse. Os resultados também mostraram que a curcumina aumenta a produção de proteínas totais em 24h e 120h, na tentativa também de auxiliar no ganho energético juntamente com o aumento de glicogênio.

O aumento da reserva energética de glicogênio na sepse é um mecanismo que o organismo utiliza para sustentar os locais que mais necessitam da oferta de glicose, como as células fagocíticas, o encéfalo e o coração durante o processo inflamatório. (CAPPI; SORIANO, 2010). O aumento na produção de glicogênio é visto em CLP 72h e 120h, nesse período os organismos conseguiram se adaptar e encontrar mecanismos para o aumento da reserva energética. Estudos da literatura mostraram que a resposta inflamatória ocorrida na sepse colabora para a desregulação do metabolismo do glicogênio durante o curso da infecção, incluindo em estágios mais tardios. Mais especificamente os mesmos estudos dizem que a taxa de fosforilação da glicose

intracelular se reduz devido a resposta antigênica exacerbada encontrada na sepse, todavia ainda é desconhecido por qual mecanismo. (TITHERADGE et al., 2007).

7. CONCLUSÃO

O tratamento com curcumina induziu uma redução no aparecimento de lesões e danos no tecido hepático, preservando parcialmente a sua integridade e funcionalidade. Foi também capaz de prevenir a redução dos níveis de glicogênio durante a sepse.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, PALMER. Sepsis 2019/2010. O que há de novo no diagnóstico, tratamento e abordagem clínica. Pubmed. ISSN 2359-3598. 2019.
2. ALVES-FILHO JC, SPILLER F, CUNHA FQ. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock*, 1: 15–21. 2004.
3. ATMADJA, et al. Effect of curcuminoids as anti-inflammatory agents on the hepatic microvascular response to endotoxin. *Shock*, 17. 2002.
4. BARBOSA, A. P et al. Critérios para diagnóstico e monitorização da resposta inflamatória. *Revista Brasileira Terapia Intensiva*, 16. 2. 2004.
- BERG, et al. Recent advances in understanding and managing sepsis. *F1000 Research*. 7. 2018.
5. BONE, RC; BALK, RA; CERRA, FB, DELLINGER, RP; FEIN, AM; KNAUS, WA;
6. SCHEIN, RM; SIBBALD, WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Critical Care Medicine*, 20: 864-874. 1992.
7. CAPPI, SB; SORIANO, F. G. Study of metabolic acidosis in patients with severe sepsis or septic shock. *Critical Care Medicine*. 2010.
8. CECCONI, et al. *Lancet*, 392 :75-87. 2018
9. CHEN, et al. Curcumin attenuates sepsis-induced acute organ dysfunction by preventing inflammation and enhancing the suppressive function of Tregs, *International Immunopharmacology*. 61: 1-7. 2018.
10. CHENG, et al. The Critical Roles and Mechanisms of Immune Cell Death in Sepsis. *Frontiers in Immunology*. 11. 2020.
11. CRAY, C; ZAIAS, J; ALTMAN, NH. Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comparative Medicine*, 59: 517-526.2009.
12. DIXON, et al. Kupffer cell in the liver. *Compr Physiol*, 2. 2013.
13. DURANTE, et al. Arginase: A Critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. 2007.
14. DHAINAUT, et al. Hepatic response to sepsis: Interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med*, 29. 2001.

15. FABIANI, et al. Evaluation of treatment of sepsis with enteral glutamine in rats. *Rev. Col. Bras. Cir*, 44: 231-237. 2017.
16. GAO et AL, 2016. Basic liver immunology. *Cellular & Molecular Immunology*, 13: 265–266. 2016.
17. GUPTA SC, et al. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 39: 283-299. 2012.
18. GADDAM et al. Differential Effects of Kupffer Cell Inactivation on Inflammation and The Liver Sieve Following Caecal-Ligation and Puncture-Induced Sepsis in Mice. *Shock*, 47: 480-490. 2017.
19. GAROFALO et al. Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis. *Intensive Care Med*. 2019.
20. GENTEK et al., 2014. Tissue macrophage identity and self renewal. *Immunol*, 1:56-73. 2014.
21. HENKIN et al. Sepsis: a current view. *Scientia Medica*, Porto Alegre, 145-195. 2009.
22. HOTCHKISS RS, KARL IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138–150.
23. JUNQUEIRA E CARNEIRO. *Histologia Básica*. 12 ed. Texto e Atlas. Guanabara e Koogan. 2013.
24. KAUR, et al. Inhibition of oxidative stress and cytokine activity by curcumin in amelioration of endotoxin-induced experimental hepatotoxicity in rodents. *Clin Exp Immunol*, 2006.
25. KOLIOS, et al. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*, 12: 7413-7420. 2006.
26. KOSKINAS, J. et al. Liver histology in ICU patients dying from sepsis: A clinicopathological study. *World J Gastroenterol*, 14: 1390-1392. 2008.
27. KRENKEL, O.; TACKE, F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nature*, 17. 2017.
28. LESCOT, et al. Liver injury acquired in the Intensive Care Unit. *Anesthesiology*, 117: 898–904. 2012.
29. LEVY, B. Lactate and shock state: the metabolic view. *Current Opinion in Critical Care*, 12: 315-321. 2006.
30. LI, et al. The role of Kupffer cells in hepatic diseases. *Molecular Immunology*, 222–229. 2018.

31. VICENT, LELULBRE. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nature Reviews Nephrology*, 14: 417-427. 2018.
32. MACHADO, F. R. et al. Chegando a um consenso: vantagens e desvantagens do Sepsis 3 considerando países de recursos limitados. *Rev Bras Ter Intensiva*, 28: 361- 365. 2017.
33. MEMIS D, et al. Curcumin attenuates the organ dysfunction caused by endotoxemia in the rat. *Nutrition Elsevier*, 24. 2008.
34. NESSELER, et al. Clinical review: The liver in sepsis. *Critical Care*, 16: 2-8. 2012.
35. RAHMANI, et al. Role of curcumin in disease prevention na treatment. *Advanced Biomedical Research*. 2018.
36. RIGATO O, SALOMAO R. Impaired production of interferon gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin-10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock*, 19: 113–116. 2003.
37. PONIKAU, J. U, et al. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: Is the histopathology similar to asthma? *Jounal Allergy Clinnical Immunology*, 112: 887-882. 2003.
38. SALOMÃO, et al. Sepsis: envolving concepts and challengs. 52. 2019.
39. SANTIAGO, et al. Curcumin, the golden powder from turmeric: insights into chemical and biological activities. *Química Nova*. 38. 2015.
40. SAVCUN, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin against hepatorenal oxidative injury in na experimental sepsis model in rats. *ExperimentalStudy. Ulus Travma Acil Cerr Derg*, 19. 2013.
41. SINGER, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315: 801–810. 2016.
42. SOARES FILHO, et al. O mapeamento da unidade funcional hepática: uma ferramenta para diagnóstico e pesquisa. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. 48. 2012.
43. SCHINONI, M. I. Fisiologia Hepática. *Gaz. méd. Bahia*. 2006.
44. SRIVASTAVA, et al. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *Int Immunopharmacol*. 2011.
45. SHRUM, et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Research Notes*, 7. 2014.
46. STRNAD, et al. Liver - guardian, modifier and target of sepsis, *Gastroenterology & Hepatology. Natures Reviews*, 14: 55-61. 2017.

47. TACKE, ZIMMERMANN. Macrophage Heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of Hepatology*. 60: 1090-1096. 2014.
48. TREFTS, et al. The liver. *Curr Biol*.2017.
49. TSUTSUI; NISHIGUCHI. Importance of kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice. *Int J. Mol. Sci*, 15: 7711-7730. 2014.
50. TIETZ, et al. *Fundamentos de Química Clínica*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2008.
51. VACHHARAJANI V, et al. Curcumin modulates leukocyte and platelet adhesion in murine sepsis. *Microcirculation*. 2010.
52. VERDONK, et al. The new sepsis definition: limitations and contribution to research and diagnosis of sepsis. *Curr Opin Anaesthesiol*, 30: 200-204. 2017.
53. WANG, et al. Advances in sepsis-associated liver dysfunction. *Burns & Trauma*, 2. 2014.
54. YAN, et al. The role of the liver in sepsis. *Int Rev Immunol*, 33: 498–510. 2015.
55. ZHANG, et al. Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis?. *Respiratory Research*. 1-3. 2018.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da curcumina sobre a expressão dos componentes da via de sinalização mTOR e na polarização de macrófagos na sepse experimental", registrada com o protocolo nº 084/19, sob a responsabilidade de **Mara Rúbia Nunes Celes** e **Jordana Fernandes de Oliveira** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de **16/09/2019**.

- Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 09/2019 a 31/05/2023
- Espécie/linhagem/raça: Camundongos, C57BL6
- Nº de animais autorizados: 396 animais
- Peso/Idade: 22 a 25 g
- Sexo: machos
- Origem (fornecedor): Biotério IPTSP / UFG

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com