

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

**VÍTOR PIQUERA DE OLIVEIRA**

**QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE MUCINAS ÁCIDAS E  
NEUTRAS NA MUCOSA CÓLICA SEM TRÂNSITO INTESTINAL,  
SUBMETIDA À APLICAÇÃO DE CLISTERES CONTENDO  
CURCUMINA.**

**Bragança Paulista**

**2017**

VÍTOR PIQUERA DE OLIVEIRA - RA 001201502496

**QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE MUCINAS ÁCIDAS E NEUTRAS NA MUCOSA CÓLICA SEM TRÂNSITO INTESTINAL, SUBMETIDA À APLICAÇÃO DE CLISTERES CONTENDO CURCUMINA.**

Dissertação a ser apresentada ao Curso de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Área de Concentração:** Biologia Celular e Molecular de Tumores

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

**BRAGANÇA PAULISTA**

**2017**

WI 522      Oliveira, Vítor Piquera de.  
O52q      Quantificação do conteúdo de mucinas ácidas e  
              neutras na mucosa cólica sem trânsito intestinal,  
              submetida à aplicação de clisteres contendo curcumina /  
              Vítor Piquera de Oliveira. -- Bragança Paulista, 2017.  
              55 p.

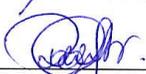
              Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-  
              Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da  
              Universidade São Francisco.  
              Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

              1. Colite. 2. Mucosa intestinal. 3. Estresse oxidativo.  
              4. Células caliciformes. 5. Curcumina . I. Martinez, Carlos  
              Augusto Real. II. Título.



**OLIVEIRA, P., Vitor**, “Quantificação do Conteúdo de Mucinas Ácidas e Neutras na Mucosa Cólica sem Trânsito Intestinal, Submetida à Aplicação de Clisteres Contendo Curcuma”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 24 de Fevereiro de 2017 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez**  
Universidade São Francisco

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Raquel de Cassia dos Santos**  
Universidade São Francisco

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Beatriz Helena de Mattos Araújo Verri**  
Universidade São Francisco

## DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a oportunidade de realizar esta tese de mestrado à Deus, pois é por Ele que hoje atuo na área acadêmica com o pró da formação discente na área médica. À minha família que desde a infância incentivou-me aos estudos e ao egresso na carreira médica e posteriormente à docência. À minha amada Maristela que me forneceu apoio, carinho e dedicação em todos os momentos me auxiliando na construção desta dissertação. Ao meu querido professor e orientador Dr. Carlos Augusto Real Martinez que de suma importância participou da minha formação médica e atualmente na orientação desta defesa. Aos meus amigos que sempre fornecerem o suporte nos momentos delicados e tortuosos da minha vida. E aos meus queridos alunos que, sem eles, nada deste sonho seria concretizado.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pois sem a mesma não seria possível a realização deste projeto científico.

Agradeço também a Universidade São Francisco (USF), através da pós-graduação strictu sensu na área da ciência da saúde, por todo o trabalho e empenho dedicados a realização e conclusão deste projeto de mestrado.

## **EPÍGRAFE**

*“ Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana. ”*

**CARL GUSTAV JUNG**

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A colite do colo excluso (CCE) é um processo inflamatório localizado em segmentos intestinais desprovidos de trânsito fecal. Sua sintomatologia é variável, relacionada à extensão do segmento e tempo de derivação fecal. A doença surge em consequência à deficiência de ácidos graxos voláteis (AGV), responsáveis pela nutrição das células do epitélio cólico promovendo o crescimento celular e estimulando a síntese de muco. O muco cólico é composto de diferentes glicoproteínas, principalmente representadas pelas mucinas. A camada de muco que recobre o intestino apresenta ação protetora contra agressões oriundas da luz intestinal. Estudos mostraram que a CCE danifica a camada de muco, diminuindo seu conteúdo e modificando sua composição. Recentemente demonstrou-se que a utilização de clisteres contendo curcumina, por sua ação antioxidante, é capaz de restabelecer a síntese mucinas, porém nenhum estudo avaliou os efeitos da curcumina no conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas na CCE.

**OBJETIVO:** Quantificar o conteúdo de mucinas ácidas e neutras na mucosa cólica sem trânsito intestinal, submetida à aplicação de clisteres contendo curcumina. **MÉTODO:** Foram utilizados 36 ratos Wistar machos, submetidos à derivação intestinal. Os animais foram subdivididos em três grupos, submetidos a irrigação com soro fisiológico a 0,9% (S.F), curcumina 50 mg/kg.dia e 200 mg/kg.dia. Os animais foram eutanasiados em duas semanas e em quatro semanas. Os segmentos cólicos desprovidos de trânsito fecal, foram removidos e analisados histologicamente pelas técnicas: hematoxilina-eosina (HE - avaliação da presença de colite), Alcian Blue (AB - identificação das mucinas ácidas) e Periódico Ácido de Schiff (PAS - coloração das mucinas neutras). Para o diagnóstico da CCE considerou-se a presença de ulcerações epiteliais, abscessos em criptas cólicas e intensidade do infiltrado inflamatório. Os resultados entre os grupos foram comparados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. **RESULTADOS:** Os clisteres com curcumina na dosagem de 50 mg/kg.dia por quatro semanas aumentou o conteúdo de mucinas ácidas em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). Na concentração de 200 mg/kg.dia, houve aumento do conteúdo de mucinas ácidas em duas semanas ( $p < 0,01$ ) e quatro semanas em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). O conteúdo de mucinas ácidas foi maior quando se utilizou 200 mg/kg.dia em duas e quatro semanas ( $p < 0,01$  e  $p < 0,04$ , respectivamente). O conteúdo de mucinas neutras foi maior no período de quatro semanas com curcumina na dosagem de 50 mg/kg.dia em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). O mesmo ocorrera com curcumina a 200 mg/kg.dia em duas semanas ( $p < 0,01$ ) e em quatro semanas ( $p < 0,01$ ). Quando comparado curcumina a 200 mg/kg.dia com a dosagem de 50 mg/kg.dia, houve aumento do conteúdo de mucinas neutras em duas semanas ( $p < 0,01$ ) e elevação deste conteúdo em quatro semanas no grupo experimental ( $p < 0,01$ ). **CONCLUSÃO:** O conteúdo tecidual de mucinas ácidas e neutras elevou-se significativamente quando utilizado curcumina na concentração de 200 mg/kg.dia por duas semanas e quatro semanas no grupo experimental, em relação ao grupo controle instilado com S.F a 0,9%. A curcumina também demonstrou importante papel como redutor do processo inflamatório tecidual na mucosa cólica exclusa, apresentando-se como uma potencial e promissora proposta terapêutica dentro da CCE.

**PALAVRAS-CHAVE:** Colite. Mucosa Intestinal. Estresse Oxidativo. Células Caliciformes. Curcumina.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Diversion colitis (DC) is an inflammatory process located in intestinal segments devoid of fecal transit. The symptomatology is variable, related to the extension of the segment and time of fecal derivation. The disease arises as a consequence of the deficiency of volatile fatty acids (AGV), responsible for the nutrition of the cells of the colonic epithelium promoting cell growth and stimulating the synthesis of mucus. Colic mucus is composed of different glycoproteins, mainly represented by mucins. The layer of mucus that covers the intestine presents a protective action against aggressions originating from the intestinal lumen. Studies have shown that DC damages the mucus layer, decreasing its content and modifying its composition. Recently it has been demonstrated that the use of curcumin containing clisteres, due to its antioxidant action, is capable of restoring the mucin synthesis, but no study has evaluated the effects of curcumin on the tissue content of neutral and acid mucins in DC. **OBJECTIVE:** To quantify the content of acid and neutral mucins in the colonic mucosa without intestinal transit, submitted to the application of clisteres containing curcumin. **METHOD:** Thirty - six male Wistar rats were submitted to intestinal diversion. The animals were subdivided into three groups, submitted to irrigation with saline solution at 0.9% (S.F), curcumin 50 mg/kg.day and 200 mg/kg.day. The animals were euthanized in two weeks and four weeks. The colonic segments devoid of fecal transit were removed and histologically analyzed by hematoxylin-eosin (HE - evaluation of the presence of colitis), Alcian Blue (AB - identification of acid mucins) and Peroxide Acid Schiff (PAS - staining of mucins neutral). The presence of epithelial ulcerations, abscesses in crypts and intensity of inflammatory infiltrate were considered for the diagnosis of DC. The results between the groups were compared by the non-parametric Mann-Whitney test. **RESULTS:** Curcumin at doses of 50 mg/kg.day for four weeks increased the content of acid mucins compared to the control group ( $p < 0.01$ ). At the concentration of 200 mg/kg.day, the content of acid mucins increased in two weeks ( $p < 0.01$ ) and four weeks in relation to the control group ( $p < 0.01$ ). The content of acid mucins was higher when 200 mg/kg.day was used in two and four weeks ( $p < 0.01$  and  $p < 0.04$ , respectively). The content of neutral mucins was higher in the four week period with curcumin at a dose of 50 mg/kg.day in relation to the control group ( $p < 0.01$ ). The same occurred with curcumin at 200 mg/kg.day in two weeks ( $p < 0.01$ ) and at four weeks ( $p < 0.01$ ). When we compared curcumin at 200 mg/kg.day at a dose of 50 mg/kg.day, there was an increase in neutral mucin content in two weeks ( $p < 0.01$ ) and increase of this content at four weeks in the experimental group ( $p < 0,01$ ). **CONCLUSION:** The tissue content of acid and neutral mucins was significantly elevated when curcumin at a concentration of 200 mg / kg.day for two weeks and four weeks in the experimental group, compared to the control group instilled with 0.9% S.F. Curcumin has also been shown to play an important role as a reductant in the inflammatory tissue process in the excluded colonic mucosa, presenting as a potential and promising therapeutic proposal within the DC.

**KEY WORDS:** Colitis. Intestinal Mucosa. Mucin. Goblet cells. Curcumin.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGV	Ácidos graxos voláteis
CCR	Câncer colorretal
CE	Colite de exclusão
COX-1	Cicloxygenase 1
COX-2	Cicloxygenase -2
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
DNBS	Ácido dinitrobenzenosulfônico
DSS	Sulfato de dextrana
Gbytes	Gigabites
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IH	Imuno-histoquímica
INF- $\gamma$	Interferon gama
iNOS	Forma induzida do óxido nítrico sintase
kg	Quilograma
LOX	Lipoxigenase
mg	Miligrama
MPO	Mieloperoxidase
NAC	N-acetilcisteína
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases (do ingles)
OH $\cdot$	Radical hidroxila
PCR	Proteína C reativa
PGE-2	Prostaglandina E-2
RAM	Random Access Memory (do ingles)
RGB	Red, Green, Blue (do ingles)
RLO	Radicais Livres de Oxigênio
TNBS	Ácido trinitrobenzenosulfônico
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	Exemplificação da colostomia com formação do estoma.	13
<b>FIGURA 2.</b>	Mucosa cólica saudável em exame endoscópico.	14
<b>FIGURA 3.</b>	Mucosa cólica com colite por exclusão.	14
<b>FIGURA 4.</b>	(4A). Mucosa cólica desprovida de trânsito fecal em modelo experimental. (4B). Mucosa cólica provida de trânsito fecal em modelo experimental.	15
<b>FIGURA 5.</b>	(5A). Superfície do epitélio do segmento desprovido de trânsito irrigada com solução salina a 0,9% para 2 semanas (HE 400x). (5B). Erosão e ulceração formações no epitélio do cólon sem trânsito fecal 4 semanas após a irrigação com solução salina a 0,9% (ele 200x).	19
<b>FIGURA 6.</b>	O epitélio cólico.	20
<b>FIGURA 7.</b>	Células colunares imaturas com presença de mucinas ácidas (coradas em azul – Alcian blue) e neutras (coradas em vermelho – peróxido de Schiff).	23
<b>FIGURA 8.</b>	Extrato da CL. Curcumina.	26
<b>FIGURA 9.</b>	Grau de inflamação da mucosa cólica exclusa de transito intestinal nos animais submetidos a intervenção com S.F 0,9%, curcumina a 50 mg/kg.dia e 200 mg/kg.dia	34
<b>FIGURA 10.</b>	Epitélio cólico excluso sob irrigação de solução salina a 0,9% durante duas semanas (à esquerda) e quatro semanas (à direita). (HE 400x).	34
<b>FIGURA 11.</b>	Conteúdo tecidual de mucinas ácidas sob irrigação de curcumina, na dosagem de 200 mg/kg.dia, durante o período de duas semanas (à esquerda - HE 200x) e quatro semanas (à direita - HE 200x).	35
<b>FIGURA 12.</b>	Porcentagem de mucinas ácidas por campo sob a intervenção com S.F 0,9% e curcumina nas concentrações de 50 mg/kg.dia e 200 mg/kg.dia, durante o período de duas semanas e quatro semanas.	36
<b>FIGURA 13.</b>	Conteúdo tecidual de mucinas neutras em epitélio cólico excluso sob irrigação de curcumina, na dosagem de 200mg, durante o período de duas (à esquerda - HE 200x) e quatro semanas (à direita - HE 200x).	36
<b>FIGURA 14.</b>	Porcentagem de mucinas neutras por campo sob a intervenção com S.F 0,9% e curcumina nas concentrações de 50 e 200 mg/kg.dia, durante o período de duas e quatro semanas.	37

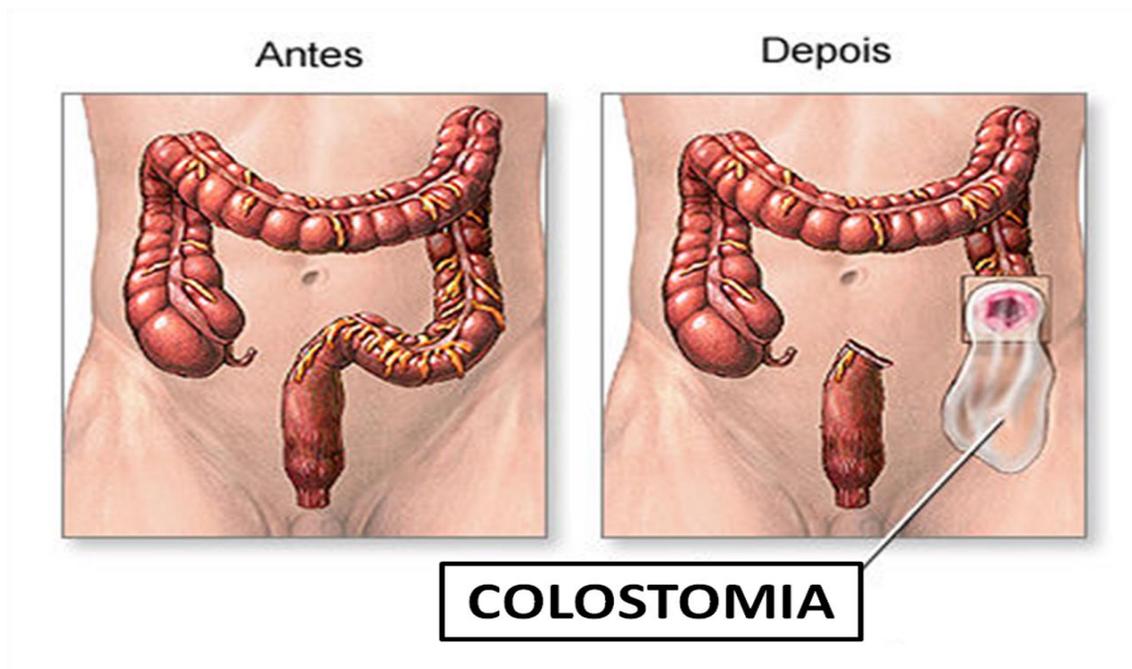
## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
1.1 Colite do colo exclusivo .....	01
1.2 Epitélio cólico .....	08
1.3 Mucinas .....	09
1.4 Mucinas e a colite de exclusão .....	11
1.5 <i>Cúrcuma longa</i> e curcumina .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1 Aspectos éticos .....	17
3.2 Experimentação animal .....	17
3.3 Técnica cirúrgica .....	17
3.4 Grupos experimentais .....	18
3.5 Coleta de amostragens .....	18
3.6 Confecção das lâminas e blocagem em parafina .....	18
3.7 Técnicas de coloração .....	19
3.7.1 Hematoxilina-eosina (HE) .....	19
3.7.2 Alcian Blue (AB) .....	19
3.7.3 Periódico Ácido de Schiff (PAS) .....	20
3.8 Análise histológica .....	20
3.9 Quantificação do conteúdo de mucinas ácidas e neutras por análise de imagem assistida por computador .....	21
3.10 Análise estatística .....	21
<b>4.0 RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
<b>5.0 DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>6.0 CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>33</b>
<b>ANEXO I - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 COLITE DO COLO EXCLUSO

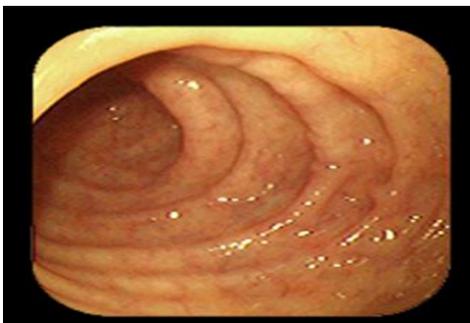
A colite do colo excluso (CE) é caracterizada pela presença de um processo inflamatório localizado em segmentos na mucosa cólica, excluídos de trânsito fecal (GLOTZER et al., 1981). É um problema de saúde pública, dado pela prevalência de doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, representados pela retocolite ulcerativa (RCUI), diverticulite, neoplasias colorretais, além do aumento da violência urbana, com traumas, acidentes por arma branca e arma de fogo, aos quais se faz necessário a indicação de cirurgias com derivação intestinal (DAVID et al., 2009). O tempo médio de espera para a reconstrução deste trânsito, em doentes com o trânsito intestinal restabelecido através de estomas, pode ultrapassar os 09 meses (HABR-GAMA et al., 1997). A figura 1 caracteriza a confecção do estoma após realização da colostomia e derivação do trânsito intestinal.



**FIGURA 1. Exemplificação da colostomia com formação do estoma.**

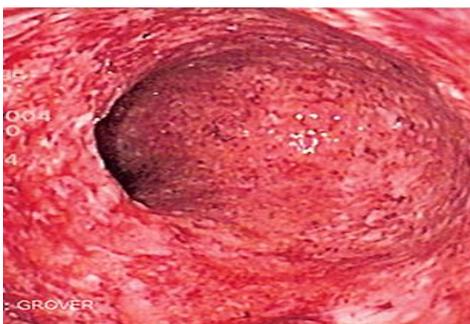
Disponível em: <https://ozimogama.wordpress.com/2013/01/04/colostomia-temporaria-quando-esta-indicada-a-reversao>

A sintomatologia é variável, estando relacionada à extensão do segmento cólico excluído de trânsito e ao tempo de exclusão fecal. Em casos iniciais da doença, observa-se uma apresentação oligossintomática, expressa principalmente pela eliminação de muco e sangue pelo colo excluído, seguidos por dor abdominal e tenesmo (LU et al., 1995). No exame endoscópico, encontramos a mucosa cólica do segmento excluído com edema, hiperemia, inturgescida, friável, com dificuldade na visualização de vasos sanguíneos na camada submucosa (MARTINEZ et al., 2012). O diagnóstico de CCE foi feito em 91% dos enfermos submetidos a exames endoscópicos sistemáticos do cólon excluído, após três meses da confecção do estoma. Quanto a apresentação da CCE após o diagnóstico endoscópico, observou-se que em 52% dos casos as alterações da mucosa cólica excluída apresentavam-se de forma leve, 40% de ocorrência moderada e 8% de apresentação grave. Além disso, a reconstrução do trânsito intestinal ocorre em menos de 20% dos casos colostomizados (DAVID et al., 2009). As figuras 2 e 3 ilustram os diagnósticos endoscópicos de um segmento cólico sadio e outro com processo inflamatório crônico, respectivamente. Ona e Boger (1985) e Habr-Gama et al. (1997) relataram a ocorrência de fissuras e fístulas perianais em casos mais avançados, o que dificulta o diagnóstico diferencial em relação com as doenças inflamatórias intestinais. Isto limita de forma considerável a qualidade de vida do doente com derivação do trânsito intestinal (WHELAN et al., 1994).



**FIGURA 2. Mucosa cólica saudável em exame endoscópico.**

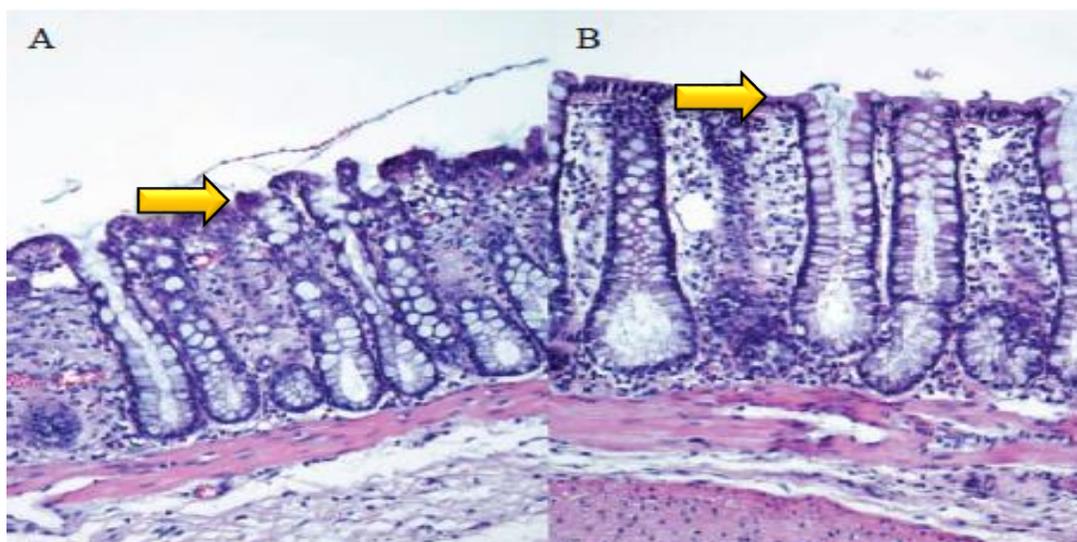
Disponível em: <http://www.coloproctolitoralsc.com.br/#!/retocolite-ulcerativa/cjb6>



**FIGURA 3. Mucosa cólica com colite por exclusão.**

Disponível em: <http://www.coloproctolitoralsc.com.br/#!/retocolite-ulcerativa/cjb6>

A CE apresenta modificações histológicas diversificadas na avaliação microscópica (GERAGHTY e TALBOT, 1991). A presença de um infiltrado inflamatório misto na mucosa cólica exclusiva, com predomínio celular neutrofílico, linfocítico, eosinofílico e macrófágico, podendo ou não evidenciar desarranjos na estrutura celular epitelial, com depleção das células caliciformes, acabam não caracterizando achados microscópicos patognomônicos da doença (ROEDIGER e NANCE, 1986; GERAGHTY e TALBOT, 1991). Os achados microscópicos mais comumente encontrados na CE são as hiperplasias linfoides nodulares (MURRAY et al., 1987; KOMOROWSKI, 1990; YEONG et al., 1991). Mesmo a CE ocasionando processos displásicos de diferentes graus na mucosa cólica exclusiva, o surgimento de neoplasias epiteliais é raro em pacientes submetidos a derivações do trânsito intestinal, isto em patologias sem correlação com as doenças inflamatórias intestinais (KISSMEYER-NIELSEN et al., 1994). Em um estudo experimental, Sousa et al. (2008) avaliaram a população celular caliciforme em mucosa cólica com desvio do trânsito intestinal. Observou-se que, mesmo com a existência de criptas cólicas, a população celular caliciforme crescia de forma diretamente proporcional se comparada às demais células do colo exclusivo, sendo o fator tempo de exclusão determinante para este achado histológico, como exemplificado na figura 4, identificados pela seta.



**FIGURA 4. (4A). Mucosa cólica desprovida de trânsito fecal em modelo experimental. (4B). Mucosa cólica provida de trânsito fecal em modelo experimental.**

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-98802011000200007>

As etiologias que circundam o processo de formação da colite de exclusão permanecem fundamentadas em teorias: deficiência de ácidos graxos voláteis (HARIG, et al., 1989); modificação da microbiota cólica (NEUT et al, 1997); isquemia da mucosa cólica (VILLANACI et

al., 2007). Dentre as teorias descritas em literatura, a deficiência de ácidos graxos voláteis (AGV) parece estar intimamente ligada com o estabelecimento da CE em mucosas cólicas exclusas de trânsito intestinal (NEUT et al., 1995; MORTENSEN, CLAUSEN, 1996; SCHEPPACH et al., 1997; KIELY et al., 2001).

Os AGV representam a principal fonte energética celular da mucosa cólica, com um substrato que corresponde a 90% do metabolismo celular na síntese de proteínas, sendo sintetizadas a partir da fermentação por bactérias pertencentes à mucosa cólica de fibras vegetais adquiridas pela dieta (ROEDIGER et al., 1980; SOERGEL, 1994; JORGENSEN et al., 1997). A derivação do trânsito fecal faz com que o colo excluído não receba os substratos metabólicos, obrigando as células da mucosa a utilizarem a glutamina como fonte energética, suplemento este obtido através da corrente sanguínea (LOPES, 2002; VELAZQUEZ et al., 1997). Entretanto este suprimento energético parece ser ineficaz no metabolismo cólico, levando a obtenção de energia através da fosforilação oxidativa, sendo esta responsável pela produção de radicais livres de oxigênio (RLO) provenientes do metabolismo celular, determinando o estabelecimento do estresse oxidativo, com processo de inflamação tecidual, determinado pelo tempo de exclusão cólica do trânsito fecal (OLIVEIRA-NETO e AGUILAR-NASCIMENTO, 2004; NASSRI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; MARTINEZ, et al., 2010; PACHECO et al., 2012). A regressão da sintomatologia da CE, após restabelecer o trânsito fecal na mucosa excluída ou ainda na aplicação de enemas com AGV no segmento excluído, reforçam essa teoria (OLIVEIRA-NETO e AGUILAR-NASCIMENTO, 2004; NASSRI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; PACHECO et al., 2012).

Os AGV são responsáveis de promover no epitélio cólico o crescimento celular, com influência sobre o trânsito e a motilidade intestinal, bem como na nutrição sanguínea e no processo de cicatrização de lesões que possam ocorrer na parede cólica. Isto foi demonstrado em modelos experimentais de CE, onde o influxo de nutrição no colo excluído de AGGC melhoram as alterações histológicas presentes (OLIVEIRA-NETO E AGUILAR-NASCIMENTO, 2004; NASSRI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; PACHECO et al., 2012). O butirato representa o substrato de energia com a maior importância da mucosa intestinal, principalmente no cólon distal, onde ocorre preferencialmente a sua absorção, correspondendo a 90% da nutrição cólica, certificando o papel de suma importância dos AGV na prevenção e no tratamento das doenças inflamatórias intestinais (ROEDIGER, 1980; SOERGEL, 1994; JORGENSEN et al., 1997). Portanto, com a reconstrução do trânsito intestinal derivado, há a restituição do mecanismo celular de obtenção energética, através do restabelecimento do suprimento cólico de AGV e dessa forma, reduzir a formação de RLO e o dano inflamatório celular a mucosa cólica (MARTINEZ, 2010). Por esse efeito antioxidante, de redução na formação de RLO e do dano ao

DNA celular, os AGV estão sendo correlacionados com a prevenção de neoplasias colorretais (SERIL et al, 2003).

A inflamação caracterizada na CE, secundária a deficiência de AGV, com agressão ao epitélio cólico, ainda não apresentam mecanismos moleculares etiológicos totalmente esclarecidos. Os modelos etiopatogênicos hoje estabelecidos não apresentam fundamentação experimental concreta para a elucidação da alteração fisiológica inicial ocorrente na agressão a mucosa cólica exclusiva, bem como não é possível explicar todos os processos bioquímicos e histopatológicos encontrados na CE (FARRELL e PEPPERCORN, 2002; HENDRICKSON et al., 2002; PRAVDA, 2005).

Como descrito anteriormente, a redução do suprimento de AGV a mucosa cólica em virtude da derivação do trânsito intestinal, promove a atrofia das criptas cólicas, reduzindo a representação celular caliciforme, que são as principais células produtoras de mucinas, responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa cólica, protegendo na forma mecânica bem como na proteção epitelial quanto a invasão bacteriana (FRANKEL et al., 1994; SOUSA et al., 2008; MELLO et al., 2012).

O processo de lesão do epitélio cólico foi compreendido, correlacionando-se a produção de níveis elevados de RLO pela estrutura celular da mucosa cólica em casos de RCUI à alteração do metabolismo energético celular (PRAVDA, 2005), sendo confirmado nos segmentos exclusivos de trânsito fecal, cujo aumento poderia hipoteticamente levar a uma significativa produção de RLO (MARTINEZ et al., 2010b). A administração de substratos antioxidantes à mucosa cólica exclusiva de trânsito fecal, poderia acarretar em uma melhoria do padrão histológico inflamatório tecidual (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al., 2011; CUNHA et al., 2011; MARTINEZ et al., 2013).

A produção de RLO ocasionada pelo dano tecidual, leva de forma progressiva a destruição das linhas de defesa da mucosa cólica, o que favorece a translocação bacteriana para a camada submucosa intestinal (PRAVDA, 2005). Em ocasião deste evento, há na parede intestinal a migração leucocitária que inicia o processo inflamatório característico da CE. (MILLAR et al., 1996; SHERIDAN et al., 1996; PRAVDA, 2005).

Os RLO são normalmente produzidos no metabolismo energético celular. As células contam com mecanismos de antioxidação inatos que auxiliam na manutenção metabólica e no equilíbrio entre a produção e neutralização de RLO (NEUT et al., 1995; MORTENSEN e CLAUSEN, 1996; SHERIDAN et al., 1996; MCCORD, 2000). No entanto, quando há um desequilíbrio nesta regulação entre produção e neutralização, há um excesso de RLO não neutralizados que iniciam o dano oxidativo celular, promovendo danos as proteínas, membranas,

organelas e, com maior importância, a bases nitrogenadas dos ácidos desoxirribonucleicos (DNA) e ribonucleicos (RNA), instaurando o dano oxidativo celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1986; BONDY e LE BEL, 1993; SCHEPPACH et al., 1997; CHEN e SCHOPFER, 1999; CADENAS e DAVIES, 2000; MØLLER, 2006; RIBEIRO et al., 2008). Modelos experimentais corroboram esta teoria quando um severo quadro de colite é iniciado após instilação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no cólon. (SHEEHAM e BRYNJOLFSSON, 1960; CAMMAROTA et al., 2007; ALMALOUF et al., 2008). Com a mucosa cólica em agressão, há um aumento na produção de RLO pelos neutrófilos, que possuem propriedades bactericidas, como resposta do sistema imune (VASINA et al., 2009). Sendo assim, parte dos RLO presentes no processo de colite podem ter seu surgimento a partir da infiltração neutrofílica, concretizando assim o processo de dano celular (FILLMANN et al., 2007).

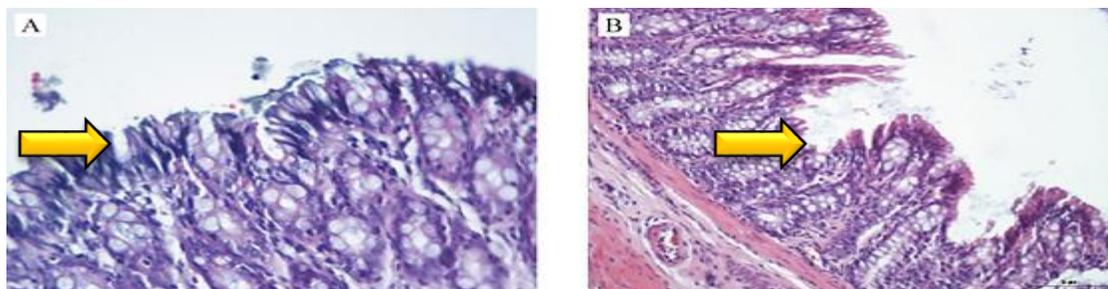
A RCUI e a CE apresentam diversos aspectos quanto a sua clínica e apresentação sintomática, mesmo sendo entidades clínicas distintas, principalmente se compararmos aspectos bioquímicos, histológicos, endoscópicos e quanto as propostas terapêuticas. A inflamação da mucosa cólica é a situação intimamente ligada entre a RCUI e a CE, que evolui com gravidade em relação ao tempo (MARTINEZ et al., 2010).

Pode-se evidenciar tais semelhanças (RCUI e CE) quando estudos experimentais compararam a infusão de agentes nutrientes como o butirato ou antioxidantes como o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) e a n-acetilcisteína (NAC) como plano terapêutico no tratamento de ambas as patologias (TRIANAFILLIDIS et al., 1991; TRIPODI; GORCEY; BURAKOFF, 1992; CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al., 2011; MARTINEZ et al, 2013). O mesmo pode ser aplicado quando se utilizou sucralfato como substância de escolha para compor o plano terapêutico das patologias citadas, substância esta que também apresenta ação antioxidante e cicatrizante tecidual, observando-se na mucosa cólica a melhora dos padrões histológicos em uma CE experimental (PEREIRA et al., 2013; CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA et al, 2015).

Recentemente, pode-se observar redução do estresse oxidativo tecidual, quando, em modelos experimentais de CE, foram aplicados enemas contendo sucralfato, constatando redução da migração leucocitária na mucosa cólica exclusiva (MARTINEZ et al., 2015). Tais evidências levam a acreditar que exista bases etiopatogênicas semelhantes entre a RCUI e a CE. No entanto, se aplicados a estudos experimentais em seres humanos, normalmente à limitações na análise quantitativa e qualitativa das alterações histológicas encontradas na CE ou sob a eficiência de inúmeras substâncias no tratamento da doença (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al, 2011; MARTINEZ et al., 2013).

A partir de tais evidências, houve a oportunidade de avaliar a ação de diversos antioxidantes celulares no processo de redução do estresse oxidativo tecidual, a fim de preservar a integridade da barreira epitelial cólica e consequentemente, auxiliar na prevenção do desenvolvimento da CE (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al, 2011; MARTINEZ et al., 2013).

No início, foram o 5-ASA e a NAC as substâncias sintéticas utilizadas como antioxidantes em modelos experimentais de CE. Verificou-se que nas aplicações de enemas contendo essas substâncias houve redução significativa do dano oxidativo celular, reduzindo o grau de inflamação tecidual do colo excluso (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al, 2011; MARTINEZ et al., 2013). A melhoria da inflamação encontrada nesses modelos experimentais era concentração-dependente e correlacionadas ao tempo de exposição dos enemas. No entanto, os efeitos colaterais do uso de 5-ASA e da NAC, bem como seu custo, apresentaram-se como os principais fatores limitantes nos tratamentos de modelos experimentais da CE (CALTABIANO et al., 2011). A figura 5 demonstra os efeitos da intervenção cólica por solução salina a 0,9% em modelo experimental de CE, com formação de abscessos e ulcerações em epitélio cólico, conforme indicado pelas setas a seguir.



**FIGURA 5. (5A).** Superfície do epitélio do segmento desprovido de trânsito irrigada com solução salina a 0,9% para 2 semanas (HE 400x). **(5B).** Erosão e ulceração formações no epitélio do cólon sem trânsito fecal quatro semanas após a irrigação com solução salina a 0,9% (HE 200x). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/>

Por esse motivo, procurou-se testar substâncias que demonstrassem efeitos antioxidantes e antiinflamatório em extratos naturais e que apresentassem melhor custo-benefício com menos efeitos colaterais. Inicialmente foi estudado os efeitos de enemas contendo em sua aplicação o extrato aquoso de *Ilex paraquariensis*, verificando-se que tal substância apresentava eficácia na redução do estresse oxidativo celular bem como na melhoria das alterações histológicas pró-inflamatórias, sendo uma opção na terapêutica de modelos experimentais de CE (CUNHA et al., 2011).

## 1.2 O EPITÉLIO CÓLICO

O epitélio intestinal representa a mais importante barreira morfofuncional existente nos seres vivos. É constituído por células cilíndricas simples, que formam uma camada colunar de células especializadas, justapostas e firmemente aderidas, separando o conteúdo rico em bactérias em meio intraluminal e antígenos, do meio interno estéril (SOUSA et al., 2008; SOUSA, 2009). É representado em sua maior parte um por células caliciformes. Este número de células caliciformes na mucosa cólica está relacionado à maior necessidade de produção de muco que, além de possuir uma ação lubrificante e na forma do conteúdo fecal, apresenta por sua vez uma ação bactericida, sendo o primeiro mecanismo de defesa da mucosa intestinal (NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009). As células epiteliais formam glândulas lineares e contíguas separadas uma das outras por uma lâmina própria, estrutura esta composta por tecido conjuntivo frouxo com influxo de inúmeras células de defesa e capilares. As glândulas cólicas, conhecidas como glândulas de Lieberkühn, em sua porção proximal são formadas por células responsáveis pela função absorptiva de água e íons existentes na luz do órgão. A região mais profunda das glândulas, também conhecida como zona germinativa ou proliferativa, possui células imaturas e células tronco intestinais, responsáveis pela substituição das células descamadas da superfície apical (SOUSA et al., 2008; SOUSA, 2009). O epitélio cólico é representado na figura 6.



**FIGURA 6. O epitélio cólico.**

Disponível em: <http://histologiaufrn.blogspot.com.br/search/label/N%C2%BA%2012%20-%20Sistema%20Digest%C3%B3rio%20-%20GI%C3%A2ndulas%20Anexas%3A>.

As células epiteliais situam-se sobre a camada muscular da mucosa, estrutura formada por pequena quantidade de fibras musculares. Esta camada tem o propósito de apoiar as células epiteliais com a finalidade de possibilitar a manutenção estrutural da mucosa intestinal (SOUSA et al., 2008; SOUSA, 2009). A camada submucosa localizada abaixo da muscular da mucosa, é

constituída por uma espessa camada de tecido conjuntivo, que fornece suporte à camada mucosa, além de apresentar um rico plexo de vasos sanguíneos e linfáticos. Na camada submucosa está localizado o plexo nervoso submucoso (plexo de Meissner). Além de participar no peristaltismo intestinal, a submucosa permite que a mucosa do cólon deslize sobre ela durante os movimentos intestinais (SOUSA et al., 2008; SOUSA, 2009). Abaixo da submucosa existem duas camadas musculares, a mais interna circular ao eixo do intestino e a externa paralela a ele. Entre as duas camadas musculares encontra-se o segundo plexo nervoso da parede intestinal (plexo de Auerbach), responsável maior pelo peristaltismo intestinal. A camada mais externa da parede do cólon é a serosa que representa o peritônio visceral do intestino grosso (SOUSA et al., 2008; SOUSA, 2009).

O processo de colite, como no caso da CE e nas demais doenças inflamatórias intestinais, ocorre mediante a agressões biológicas, químicas ou físicas existentes, com a necessidade de que ocorra ruptura da barreira epitelial cólica representada pela mucosa intestinal, possibilitando a invasão bacteriana da submucosa com a conseqüente resposta inflamatória que caracterize a doença (NONOSE et al., 2009).

### 1.3 MUCINAS

Segundo Junqueira e Carneiro (2008):

O epitélio cólico possui uma composição histológica diferenciada se comparados aos demais tipos celulares encontrados nos seres vivos, sendo sua mucosa composta por células colunares simples, das quais são as principais representantes os enterócitos ou colonócitos, as células enteroendócrinas, células de Paneth e as células caliciformes. As criptas intestinais, conhecidas como glândulas de Lieberkühn, são compostas em sua maioria de células caliciformes, cujo a principal função é a produção de muco cólico, sendo diferenciado em meio endoplasmático celular subtipos celulares chamado de mucinas e também na conjugação de proteínas de adesão celular. A mucosa cólica apresenta composições variadas em diferentes seguimentos do intestino, isto em razão das funções fisiológicas exercidas pelo cólon proximal e distal, tendo o primeiro a proposta de absorção de água e eletrólitos enquanto o segundo pela composição e armazenamento fecal, ao qual o faz necessitar de uma produção aumentada de muco para a progressão do conteúdo fecal ao longo do trato intestinal.

Esta diferenciação funcional da mucosa cólica ao longo do trato intestinal é subproduto da expressão das mucinas (FILIFE, 1979).

As células caliciformes, produtoras de muco, representadas pelas mucinas, possuem a função de hidratar a cobertura gelatinosa que se adere ao epitélio cólico, servindo como proteção a processos mecânicos e a invasão bacteriana, caracterizando o principal fator protetor da mucosa cólica (GOLD et al., 1981).

Possíveis alterações da composição proteica do epitélio cólico ou até mesmo na expressão genética podem prejudicar a função protetora da barreira de muco no cólon. As mucinas, mesmo

sendo pertencentes à mesma classe de proteínas, apresentam estrutura, localização e função diferentes, sendo classificadas funcionalmente em: mucinas secretoras, cuja função é de defesa do epitélio gastrointestinal; mucinas ligadas à membrana, com função de adesão, sinalização e crescimento celular; e mucinas solúveis, encontrada na saliva (BOBEK et al., 1993; GENDLER e SPICER, 1995; vanLINKEN et al., 1995; DEKKER et al, 2002).

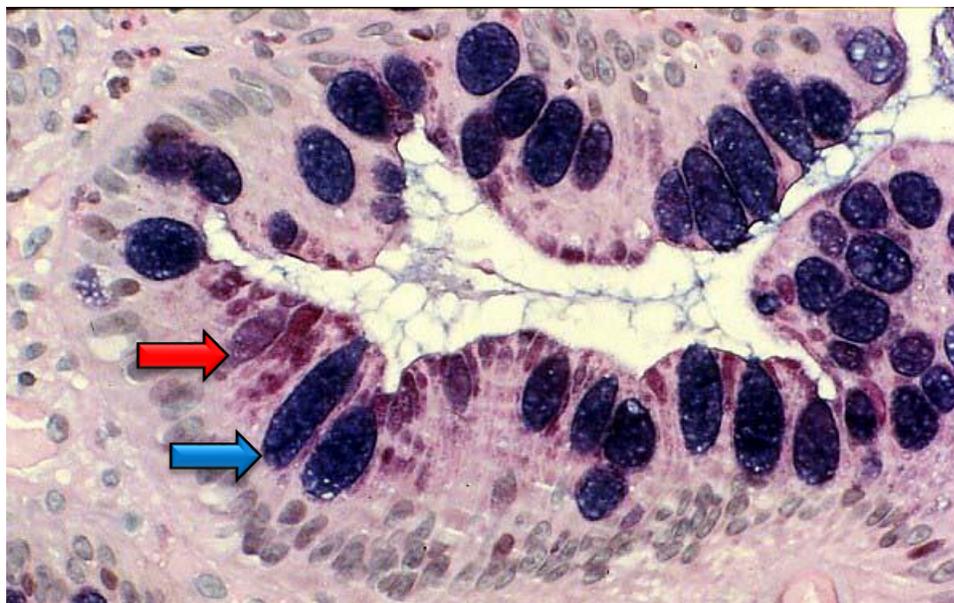
Estudos avaliando a influência dos AGV, em especial o butirato, demonstraram que a expressão genica relacionados à síntese de mucinas é influenciada pelo acréscimo do butirato, com aumento em sua expressão, em meios de cultura celular, confirmando a importância dos AGV na manutenção da síntese proteica do epitélio cólico (GAUDIER e HOEBLER, 2006).

As mucinas também podem ser classificadas de acordo com a fração glicídica molecular, sendo divididas em: mucinas neutras (ricas em glicogênio) e ácidas (ricas em ácido siálico ou radicais sulfato) (SPICER et al., 1965; LEPI e SPICER, 1966). Apesar destas diferenciações químicas, os dois tipos de mucinas aparentemente possuem as mesmas funções biológicas (FIPIPE, 1969). As mucinas neutras são as células mais encontradas no interior das células caliciformes, representando 80% do conteúdo de mucinas do trato gastrointestinal (GOLD et al., 1981).

Pesquisas há mais de 40 anos avaliam a expressão tecidual de mucinas ácidas e neutras na mucosa cólica. Estudos com avaliação histoquímica da transcrição proteica na mucosa cólica em seres humanos identificaram que a distribuição das mucinas, bem como seu padrão celular, se faz de forma singular nos diferentes segmentos cólicos (SHEAHAN e JERVIS, 1976). As mucinas neutras em epitélios cólicos normais se expressam de forma geram com maior intensidade nos seguimentos proximais do trato gastrointestinal (estômago e duodeno), enquanto as mucinas ácidas apresentam maior expressão a partir da flexura duodeno-jejunal (LEV e SPICER, 1964; GOLDMAN E MING, 1968; FILIPE, 1979; SHEAHAN, 1976). As criptas cólicas são maiores, mais profundas, com adaptações a função absorptiva em seguimentos proximais, enquanto no cólon distal, as criptas são menos profundas e com maior quantidade de células caliciformes, com funções de facilitar a progressão do conteúdo fecal pela lubrificação cólica (GERVAZ et al., 2001).

A expressão das mucinas, bem como seu subtipo e distribuição nas criptas cólicas, são modificadas quando acometidas por patologias do trato gastrointestinal (FILIPE, 1979; MIMURA et al., 1999; UCHIDA et al., 2001. CASTRO et al., 2006). Nas colites inespecíficas, as mucinas ácidas encontram-se diminuídas, em locais onde o processo inflamatório é mais intenso, com expressão irregular, podendo até não serem identificadas (FILIPE, 1979). Já na RCUI, há uma redução importante das mucinas neutras, sendo em alguns casos ausente (FILIPE, 1979). A figura 7 mostra

em corte histológico segmentar de uma cripta cólica, sendo evidenciado em coloração as mucinas ácidas e neutras, conforme indicação pelas respectivas setas.



**FIGURA 7. Células colunares imaturas com presença de mucinas ácidas (coradas em azul – Alcian blue) e neutras (coradas em vermelho – peróxido de Schiff).**

*Disponível em: [http://www.conganat.org/7congreso/trabajo.asp?id\\_trabajo=521](http://www.conganat.org/7congreso/trabajo.asp?id_trabajo=521)*

Na CE, o principal fator responsável pelo espectro histológico encontrado parece ser a secreção de mucinas, levando a discussões quanto aos aspectos etiopatogênicos envolvidos (KELI et al., 1997). Foram poucos os estudos que avaliaram na CE a expressão de mucinas ácidas e neutras em segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal (KELI et al., 1997; NONOSE et al., 2009; BARTOCCI et al., 2010; MARTINEZ, 2010). O que foi estudado até o presente momento na CE é quanto a ocorrência da diminuição do conteúdo de mucinas ácidas e neutras, se comparados a segmentos cólicos providos de trânsito fecal, no entanto, a pouco conhecimento quanto infusão de substâncias no cólon excluso e a expressão tecidual de mucinas.

#### **1.4 MUCINAS E A COLITE DO COLO EXCLUSO**

O epitélio cólico apresenta ao longo de seu segmento padrões de expressão de mucinas diferentes, disposição esta que diretamente ligada a funcionalidade do tecido cólico, sendo verificado predomínio de mucinas ácidas em mucosa que reveste o intestino grosso (FILIFE,

1979). As mucinas neutras apresentam expressão em determinados segmentos do colo esquerdo e reto, localizando-se nas porções apicais das vilosidades cólicas (SPICER, 1965; FILIPE, 1979).

Estudo realizado em modelos experimental identificou que a expressão de mucinas ácidas aumenta em segmentos cólicos distais, em caráter crescente, partindo-se do ceco até a porção distal do colón descendente, sendo observado em igual forma, uma diminuição da expressão de mucinas neutras nestes segmentos descritos, podendo-se notar que o conteúdo de mucinas, bem como sua distribuição ao longo do intestino grosso apresenta semelhanças quando equiparados modelos experimentais animais e seres humanos (SAKATA e VON ENGELHARDT, 1981).

Ao observarem o comportamento das doenças inflamatórias que se instalam na mucosa cólica, foi possível observar que o conteúdo e distribuição de mucinas são modificados, sendo o principal exemplo de tal situação, a RCUI, com instauração de um processo inflamatório crônico e progressivo, principalmente em colón esquerdo predominante em expressão de mucinas ácidas (FILIPE, 1969; MIMURA et al., 1999; UCHIDA et al., 2001; CASTRO et al., 2006), enquanto as mucinas neutras podem eventualmente estarem ausentes (FILIPE, 1979).

Em situações de colites inespecíficas, as mucinas têm sua expressão diretamente proporcional a inflamação cólica, sendo que por vezes sua identificação pode não ocorrer, pois sua distribuição encontra-se irregular, isto sendo aplicado tanto a mucinas ácidas quanto neutras (FILIPE, 1979). Com a cronicidade do processo, é possível que ocorra a mudança da composição epitelial cólica e presença de epitélio de transição (FILIPE, 1979; MIMURA et al., 1999; UCHIDA et al., 2001; CASTRO et al., 2006).

Portanto, ao avaliarmos a CE, torna-se fundamental o olhar para a situação histológica que se encontra a mucosa cólica, com a mudança da expressão de mucinas, que compõe a barreira de muco protetora do colón, sendo de suma importância o estudo dos aspectos patológicos encontrados (KELI et. al., 1997), isto replicado em modelos experimentais de CE, em que seja possível equipararem o conteúdo de expressão de mucinas ácidas e neutras, em segmentos desprovidos e providos de trânsito intestinal.

## **1.5 CÚRCUMA LONGA E CURCUMINA**

A *Cúrcuma Longa* (CL), também conhecida por açafão-da-índia, açafroa, tumérico, mangarataia, batatinha amarela, gengibre dourado e gengibre amarelo, é uma planta herbácea, originária do sudeste da Ásia (Índia e Indonésia), pertencente à ordem das *Zingiberales* e da

família Zingiberaceae, ao qual viera ao Brasil em meados da década de 80 (MAY et al., 2005; ALMEIDA, 2006). O rizoma da CL é a região de maior importância, e também de interesses comerciais, pois é a partir dele que se extraem diferentes substâncias com propriedades anti-inflamatórias e antioxidante, principalmente (ALMEIDA, 2006). O rizoma na visualização externa apresenta uma coloração esbranquiçada ou acinzentada e internamente uma coloração amarelada intensa. (ALMEIDA, 2006). O cultivo da CL é relativamente fácil de ser feito, com adaptação ao local de cultivo, disseminando-se, partindo do rizoma central para os rizomas laterais. A planta apresenta alta resistência e durabilidade, reproduzindo-se por pedaços dos rizomas que apresentam gemas (olhos) com plantio em solo argiloso, fértil e de fácil drenagem (ALMEIDA, 2006).

O extrato obtido do rizoma da CL é conhecido como curcumina ou diferuloilmetano, cujo o pigmento é um pó amarelo-alaranjado, de sabor amargo e aroma picante, insolúvel em água em seu estado natural e responsável pela coloração amarelada da raiz. (JURENKA, 2009). A curcumina foi inicialmente identificada por Lampe e Milobedzka em 1910, sendo observado que o extrato da planta possui uma concentração 18 vezes maior quando comparados aos compostos naturais encontrados na raiz da planta nativa. Este pigmento presente em maior quantidade é comumente utilizado como corante para comida sendo um dos ingredientes contidos no pó de curry (JURENKA, 2009). O diferuloilmetano, princípio ativo da curcumina, é um polifenol natural isolado do rizoma da planta, apresentando importante ação antioxidante (FU et al., 2008; MANDAL et al., 2009; SAMUHASANEETO et al., 2009; VILLEGAS; SÁNCHEZ-FIDALGO; DE LA LASTRA, 2011; MURAKAMI et al., 2013). A figura 8 abaixo ilustra o extrato obtido a partir da CL, a curcumina.



**FIGURA 8. Extrato da *Curcuma longa*. Curcumina.**  
Disponível em: [http://en.wikipedia.org/wiki/Curcuma\\_longa](http://en.wikipedia.org/wiki/Curcuma_longa)

A utilização da curcumina na medicina foi quase que em sua totalidade apoiada pela medicina Ayurvédica, com sua utilização em medicamentos naturais de propriedades anti-inflamatórias. (FOLTZ-GRAY, 2005; JURENKA, 2009). Diversas propriedades medicinais têm sido atribuídas ao extrato da CL ao longo do tempo. Na China, a curcumina é utilizada como analgésico, antiespasmódico e vermífugo (JURENKA, 2009). Já na Índia como medicamento para o tratamento de dermatites, doenças dispépticas, doenças musculares e artrite (CHANDRA, GUPTA, 1972; ALMEIDA, 2006; JURENKA, 2009). Na Europa, foi utilizada no tratamento da dispepsia, úlcera anterior crônica e na erradicação da *Helicobacter pylori* (KOOSIRIRAT et al., 2010). Nos Estados Unidos, a curcumina é liberada pelo FDA e vem sendo estudada com interesse crescente em pesquisas sobre o mal de Alzheimer, déficit de memória, artrite experimentalmente induzida, em animais de experimentação, osteoartrite, diabetes e, principalmente, no câncer colorretal e de Fígado (SHAKIBAEI et al., 2013; XU et al., 2013; AHMED; GILANI, 2014; ZHAO et al., 2014). Em virtude destas indicações terapêuticas que circundam o uso da curcumina em seu extrato oleoso, atualmente muito se estuda sobre seus efeitos sobre a resposta inflamatória tecidual, reduzindo os RLO formados durante este processo. Pesquisas *in vitro* e *in vivo* vêm sugerindo que, pelo fato da curcumina possuir efeito antioxidante, esta possa agir sobre a carcinogênese, reduzindo o dano oxidativo ao DNA celular e, conseqüentemente o desenvolvimento de mutações, reduzindo a expressão nuclear de  $\beta$ -catenina e citocinas pró-inflamatórias aos quais foram os primeiros autores a avaliarem os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da curcumina em modelo experimental de colite induzida por TNBS em camundongos (SUGIMOTO et al., 2002). Verificou-se que a administração oral de curcumina melhorava e prevenia as alterações inflamatórias na colite experimental, sugerindo que a substância pudesse conter potencial efeito terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais. Diante do resultado deste estudo piloto, diversos autores realizam estudos na prerrogativa de identificar efeitos anti-inflamatórios em diferentes modelos experimentais de colite quimicamente induzida (SALH et al., 2003; UKIL et al., 2003; JIANG et al., 2006; YANG et al., 2013; ZENG et al., 2013).

A curcumina apresenta múltiplos mecanismos de ação. Nas últimas décadas estudos demonstraram que a curcumina em associação a drogas utilizadas na terapêutica das doenças inflamatórias intestinais, representadas pela mesalazina e sulfasalazina, é eficaz, bem tolerada e capaz de auxiliar na remissão clínica da doença, prevenindo recidivas bem como reduzindo seus índices de atividade (BALIGA et al., 2012). A substância apresenta um eficiente mecanismo antioxidante, estimulando a ação dos sistemas antioxidantes teciduais, removendo os RLO produzidos em excesso, além de interferir em múltiplas vias de sinalização celular,

particularmente as vias da quinases promovendo a diminuição da produção tecidual de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ ), com inibição da infiltração neutrofílica, reduzindo a atividade da mieloperoxidase (MPO) nos tecidos. Concomitantemente reduz a atividade das COX-1, COX-2, PGE-2, PCR, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , iNOS e, principalmente, inibe o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, podendo inclusive modular as proteínas correlacionadas à adesão celular (BALIGA et al., 2012; GUPTA et al., 2013). Pode-se concluir a partir desses efeitos descritos que, nos modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais, a utilização de enemas contendo o extrato da curcumina pode resultar em uma promissora melhoria nos índices de atividade da doença (SINGLA et al., 2014).

Apesar de demonstrado os benefícios da curcumina em modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais bem como na colite quimicamente induzida, na atualidade nenhum estudo avaliou os efeitos tópicos da substância em modelos experimentais ou em doentes portadores de CE (JAISWAL et al., 2002; PRASAD et al., 2009; MUKHERJEE et al., 2014).

É possível pensarmos que, a curcumina, por apresentar propriedades antiinflamatório e antioxidantes celulares possa neutralizar a elevada produção de RLO pelas células da mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal, e assim, levantar a hipótese de manutenção da integridade da defesa epitelial cólica. Na atualidade, diversos estudos vêm demonstrando o papel da curcumina, ao qual fez com que esta substancia fosse utilizada em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais, estendendo-se a utilização em modelos experimentais de colite quimicamente induzida, estudos estes com resultados promissores (KUMAR et al., 2012; LIU et al., 2013; SAREEN et al., 2014; SINGLA et al., 2014; VECCHI BRUMATTI et al., 2014; LANGHORST et al., 2015). Contudo, nenhum estudo avaliou os efeitos da curcumina no conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas na CCE. Dar-se então a importância do tema.

## **2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

- Avaliar os efeitos da aplicação de clisteres de curcumina na recuperação do processo inflamatório da mucosa cólica em modelo experimental de CCE.

### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Quantificar o conteúdo de mucinas ácidas e neutras em segmentos cólicos desprovidos de trânsito intestinal submetidos a aplicação de clisteres contendo curcumina, em modelo experimental de CCE.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos éticos**

O presente estudo segue às regulamentações da lei Federal Nº. 11.794, sob as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Francisco (Projeto Nº 22.11/07). O ANEXO I contém a cópia do parecer acima citado.

#### **3.2. Experimentação Animal**

Utilizaram-se 36 ratos Wistar machos, com pesagem entre 300 e 350 g, oriundos da Biolab Sanus Farmacêutica LTDA, Paulínia, São Paulo, Brasil. Os animais foram separados e mantidos de forma individual, identificados em caráter numeral e sob ordenação de grupo e subgrupo do experimento, em ambiente com estímulo mínimo ao estresse (controles de ruído, iluminação e climático). Foi proposto pré-intervenção cirúrgica jejum durante 12 horas, excetuando-se água. Os animais foram sinalizados com tinta nanquim em sua porção caudal, sendo alimentados com nutrientes próprios de igual forma, recebendo verificação de peso semanal. Não houveram substituições durante o estudo bem como morte animal.

#### **3.3. Técnica Cirúrgica**

O procedimento cirúrgico do presente estudo foi realizado sob anestesia geral em todos os animais, com administração de 0,1 ml/100 g de 1:1 (v/v) solução de quetamina (50 mg/ml) e xilazina (20 mg/ml) via peritoneal. Com a sedação cirúrgica realizada, os animais foram devidamente fixados à mesa cirúrgica, recebendo tricotomia em sítio cirúrgico. Realizado incisão longitudinal de forma mediana com 03 cm de amplitude, sendo a colostomia realizada jusante ao ceco em 02 cm. Realizado secção do cólon direito após ligadura marginal de vasos sanguíneos, fixando a oostomia por quatro pontos cardinais com sutura em fio absorvível monofilamentar 5-0, de forma separada a porção terminal em fossa ilíaca direita. O segmento caudal cólico direito foi cateterizado com a instilação de 40 ml de soro fisiológico a 0,9% a 37°C, até que não houvessem resíduo fecal em ampola retal. A porção distal da colostomia foi fixada de igual forma a porção proximal, após ocorrer total instilação de solução fisiológica à 0,9% e 37°C. Realizado em parede abdominal, primeiramente em peritônio e posteriormente em aponeurose, síntese com fixação contínua, utilizando fio cirúrgico nylon 4-0, com sutura cutânea sob mesmo fio cirúrgico em pontos separados.

### **3.4. Grupos experimentais**

Em três grupos foram divididos os animais no experimento de forma aleatória, contendo cada subgrupo 12 ratos Wistar. O primeiro grupo intitulado como controle, recebera enemas retais diários contendo soro fisiológico a 0,9%. Os grupos experimentais, contendo segundo e terceiro subgrupos respectivamente, recebera enemas contendo extrato oleoso de curcumina (Sigma Aldrich do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) em diferentes concentrações: 50 mg/kg.dia e 200 mg/kg/dia, respectivamente. Estas concentrações de curcumina utilizadas baseiam-se quanto à aplicação terapêutica, como descrito em literatura em estudos previamente realizados. Em cada subgrupo contendo seis animais, houve no primeiro o sacrifício após o período de duas semanas de estudo, enquanto no subgrupo subsequente houve o sacrifício após quatro semanas de estudo. A eutanásia dos animais após o experimento ocorreu sob anestesia, com a utilização de sobre dose de tiopental intracardiaco<sup>5</sup>, seguindo as orientações fornecidas pelas diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL).

### **3.5. Coleta de Amostras**

Após as intervenções propostas durante o período de duas e quatro semanas, os animais pertencentes aos respectivos subgrupos foram anestesiados com a mesma técnica descrita anteriormente. Com o abdome animal em nova abordagem cirúrgica, removeu-se o segmento cólico como um todo, que foi submetido as intervenções sob as concentrações supracitadas. O segmento cólico retirado foi lavado com soro fisiológico a 37 °C longitudinalmente e subdividido em dois fragmentos contendo quatro centímetros de comprimento. Os fragmentos obtidos foram sempre retirados a uma distância localizada padrão de dois centímetros acima da placa de Peyer. Fixados, os dois fragmentos, com a superfície mucosa voltada para cima foram encaminhados para estudo histológico e histoquímico.

### **3.6. Confecção das lâminas e blocagem em parafina**

Em solução tamponada de formaldeído a 10% (Sigma, St. Louis, MO, USA) os fragmentos foram imersos por 24 horas. Os fragmentos cólicos foram submetidos a banhos de álcool em concentrações crescentes, sendo uma hora de duração cada imersão na totalidade de cinco imersões, com propósito de desidratação. Na sequência, submetidos a xilol, com três imersões com duração de uma hora cada. Subsequentemente os fragmentos foram submetidos a três banhos de parafina com duração de uma hora cada sob temperatura de 60°C contínua, sendo posteriormente inclusos em blocos parafinados. Para a montagem das lâminas, foram realizados

cortes histológicos de 05 µm de espessura nos respectivos blocos, sendo estes posteriormente retirados da parafinagem com xilol, com imersões de duração de dez minutos, seguidos de três banhos de álcool absoluto consecutivos com duração de três minutos e finalização com hidratação por água destilada durante três minutos. Todas as lâminas foram confeccionadas por um mesmo técnico e analisadas com microscópio óptico comum (Nikon Eclipse DS-503) com magnificação final de 200x. As análises foram realizadas por patologista com experiência em patologias colorretais, sem o conhecimento dos objetivos do presente estudo.

### **3.7. Técnicas de Coloração**

Os materiais contidos nas lâminas dos animais do grupo controle e experimento foram submetidas as técnicas de coloração: Hematoxilina-Eosina (HE – que avaliam as alterações histológicas diagnósticas de CE), Alcian Blue (AB – responsável pela identificação tecidual de mucinas ácidas) e Periódico Ácido de Schiff (PAS – responsável pela identificação tecidual de mucinas neutras). Todas as lâminas possuíam uma das extremidades fosca onde anotou-se o número do animal, o grupo experimental a que pertencia e a técnica de coloração adotada.

#### **3.7.1. Hematoxilina-Eosina (HE)**

Utilizou-se à hematoxilina de Harris nas lâminas obtidas, com filtragem em temperatura ambiente por um minuto, seguido de lavagem contínua e cuidadosa com água corrente e água destilada por três minutos, respectivamente. As lâminas foram expostas ao corante eosina por dois minutos a temperatura ambiente. Após este período, repetiu-se nas lâminas as lavagens em água corrente e posteriormente em água destilada por mais dois minutos sob temperatura ambiente. Terminada a lavagem, foram desidratadas em três banhos sucessivos de álcool absoluto, e diafanizadas em xilol, seguida de montagem com resina e lamínulas.

#### **3.7.2. Alcian Blue (AB)**

Ao se utilizar aplicação do corante azul de Alcian (AB), os cortes histológicos foram devidamente separados conforme técnica histológica supra acima citada, sendo expostos durante 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, os fragmentos foram dispostos sobre as lâminas, sendo expostos ao ácido acético a 3% em uma única passagem a temperatura ambiente na etapa de descoloração. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas contínua e cuidadosamente com água corrente por cinco minutos a temperatura ambiente e desidratada em três banhos sucessivos de álcool absoluto. Terminada a desidratação foram diafanizadas em três

banhos de xilol. As lâminas já coradas foram secas por três minutos e terminado esse tempo, montadas com resina e lamínula.

### **3.7.3. - Periódico Ácido de Schiff (PAS)**

Os cortes histológicos foram igualmente preparados como citado anteriormente, sendo expostos pelo período de 60 minutos ao ácido periódico em temperatura ambiente. Terminada a coloração realizou-se a lavagem contínua e cuidadosa inicialmente com água corrente e posteriormente com água destilada por três minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem, o material foi exposto ao reativo de Schiff pelo período de 60 minutos em temperatura ambiente e, novamente lavada em água corrente e destilada por cinco minutos. Com o termino da lavagem, as lâminas foram coradas opostas com hematoxilina de Harris por dois minutos à temperatura ambiente. Após a coloração oposta foram novamente lavadas em água corrente e água destilada por três minutos e desidratadas, em três banhos sucessivos de álcool absoluto, durando três minutos cada banho, e diafanizadas em três banhos de xilol. Após diafanização foram montadas com resina e lamínulas.

### **3.8. Análise histológica**

As lâminas foram analisadas por patologista com experiência na área de doenças inflamatórias intestinais, que desconhecia a qual subgrupo do estudo o material em presente análise pertencia, utilizando para tal análise microscópio óptico (Eclipse DS-50i, Nikon Inc., Osaka, Japan). Foram realizadas fotografias utilizando sistema digital de captura (DS-Fi-50; Nikon Inc, Osaka, Japan) previamente acoplado ao microscópio. Diante dos parâmetros resultado da análise das lâminas, o diagnóstico CE foi considerado diante dos seguintes achados histopatológicos: perda de superfície - ulcerações epiteliais, infiltrado inflamatório e sua intensidade, criptas cólicas abcessadas e presença de fibrose epitelial, atribuindo de zero a três cruces (0 = ausente; + = leve; ++ = moderada e +++ = grave) para cada variável, que quando somadas formaram o escore de graduação inflamatória para a presença de colite. A leitura das lâminas foi realizada com magnificação final de 200x e sempre feita em local onde existissem pelo menos três glândulas cólicas íntegras e contíguas. Adotou-se o escore inflamatório em cada lamina experimental animal obtida como resultado, sendo a média obtida após a leitura de três campos distintos. As lâminas que não permitiram preencher tal critério foram descartadas da análise estatística.

### **3.9. Quantificação do conteúdo de mucinas neutras e ácidas por Análise de Imagem Assistida por Computador**

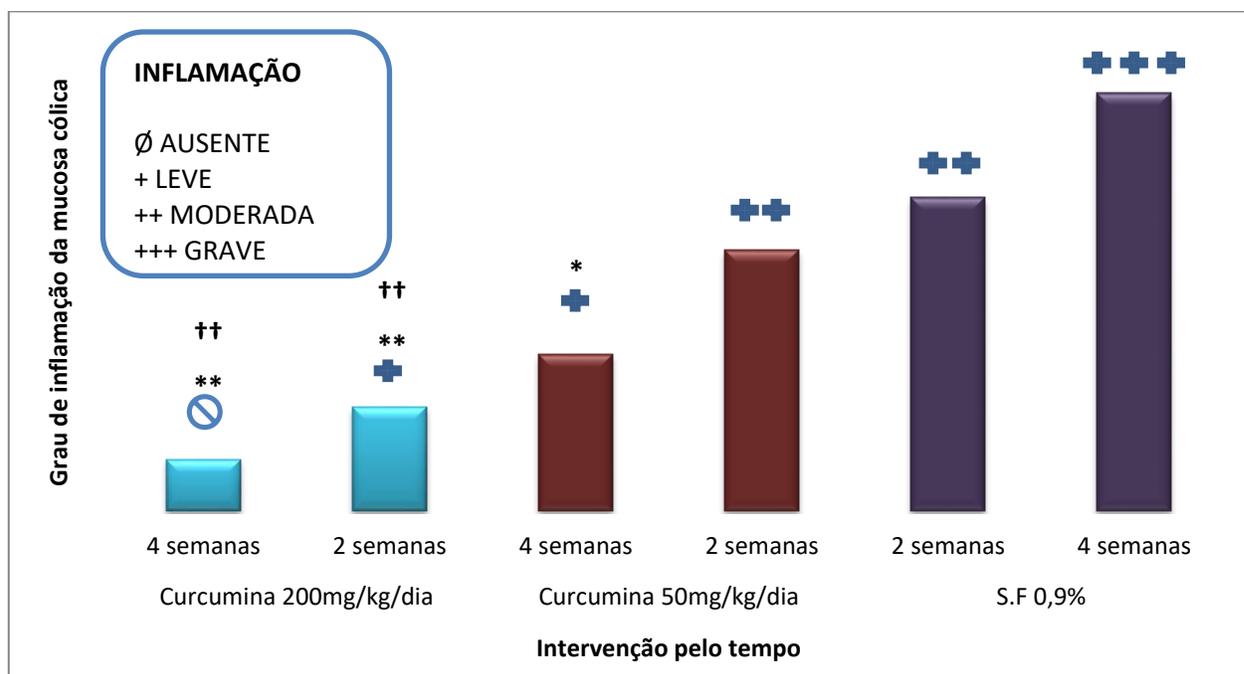
A mensuração da expressão tecidual de mucinas foi obtida a partir da análise de imagens pelo sistema NIS-Elements<sup>®</sup> (Nikon Inc., Japan), versão 3.0, que utiliza a imagem capturada por câmera previamente acoplada ao microscópio óptico. O programa determinava a intensidade da coloração escolhida através de histogramas de cor no sistema RGB (red, green, blue), onde as mucinas ácidas quando coradas na lâmina pelo AB seriam identificadas pela coloração azul claro, enquanto as mucinas neutras, foi possível a identificação nas lâminas através da coloração magenta, quando coradas pelo PAS. Para isto, utilizou-se a contagem de pixels em caráter numeral em cada campo selecionado, transformando o conteúdo final de mucinas neutras e ácidas encontradas em valores percentuais por campo (%/campo). Da mesma forma a leitura foi feita em campo focal que apresentasse três glândulas íntegras e contíguas. O valor final considerado para o conteúdo de mucina neutra e ácida em cada animal foi à média obtida após a leitura de três campos histológicos.

### **3.10. Análise estatística**

A quantificação de mucinas neutras e ácidas foi mensurada através da contagem de pixels por campo de imagem em microscópio óptico. Para a realização das provas estatísticas, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Nos testes, o nível de significância adotado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ), sendo o programa Biostat<sup>®</sup> versão 5.0 o instrumento estatístico utilizado. Os valores significantes à 5% foram marcados com um asterisco (\*) enquanto os valores com significância de 1% com dois (\*\*).

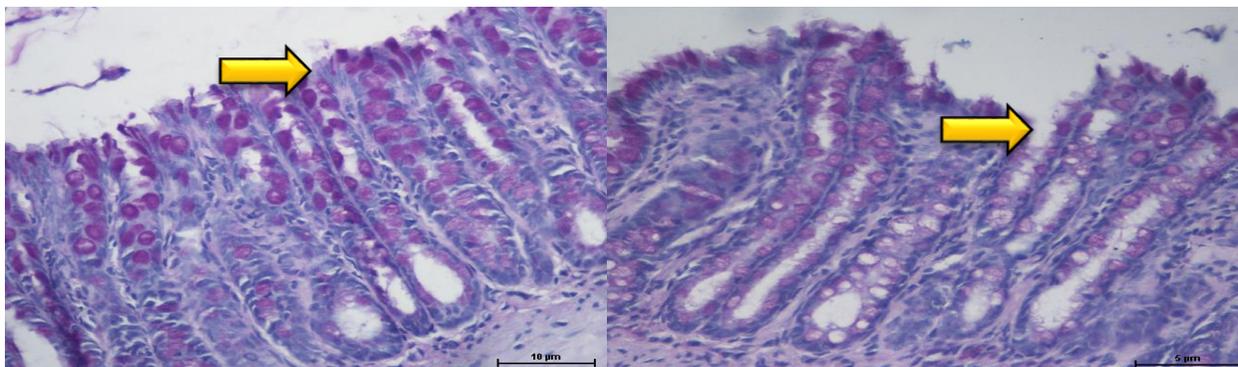
#### 4. RESULTADOS

Na figura 9 mostra a comparação do escore inflamatório nos animais submetidos a intervenção com S.F a 0,9%, curcumina a 50 mg/kg.dia e 200 mg/kg.dia, durante o tempo de duas semanas e quatro semanas. A análise dos resultados obtidos foi através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.



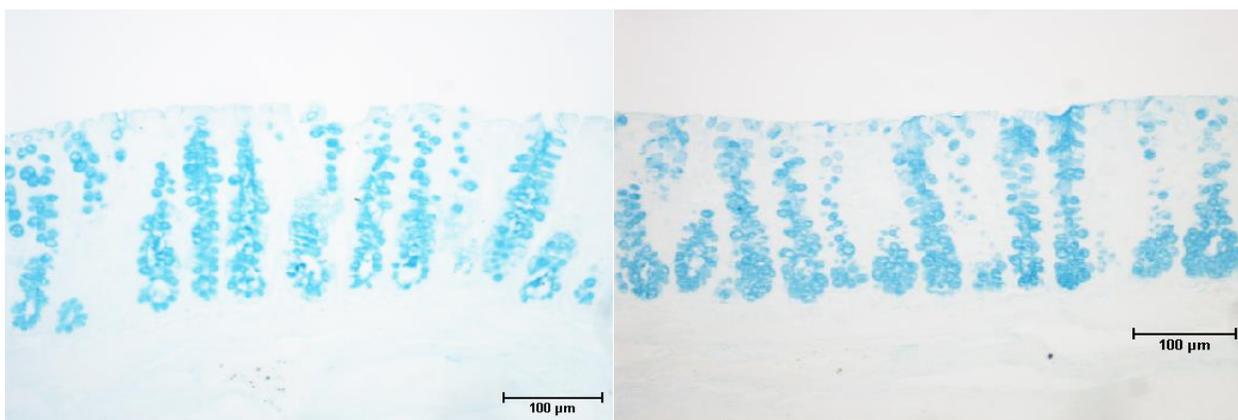
**FIGURA 9.** Grau de inflamação da mucosa cólica exclusiva de transito intestinal nos animais submetidos a intervenção com S.F 0,9%, curcumina a 50 mg/kg.dia e 200 mg/kg.dia. Teste de Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ .

A figura 10 apresenta os conteúdos das lâminas do grupo controle, sob intervenção de irrigação com solução salina a 0,9% durante os períodos de duas semanas e quatro semanas. Nota-se na figura à esquerda, indicado pela seta, o cólon com desestruturação inicial do epitélio durante o período de duas semanas. À direita, conforme a seta, após quatro semanas, identificou-se epitélio cólico desorganizado, ulcerado, com destruição das cólicas e diminuição de células caliciformes.



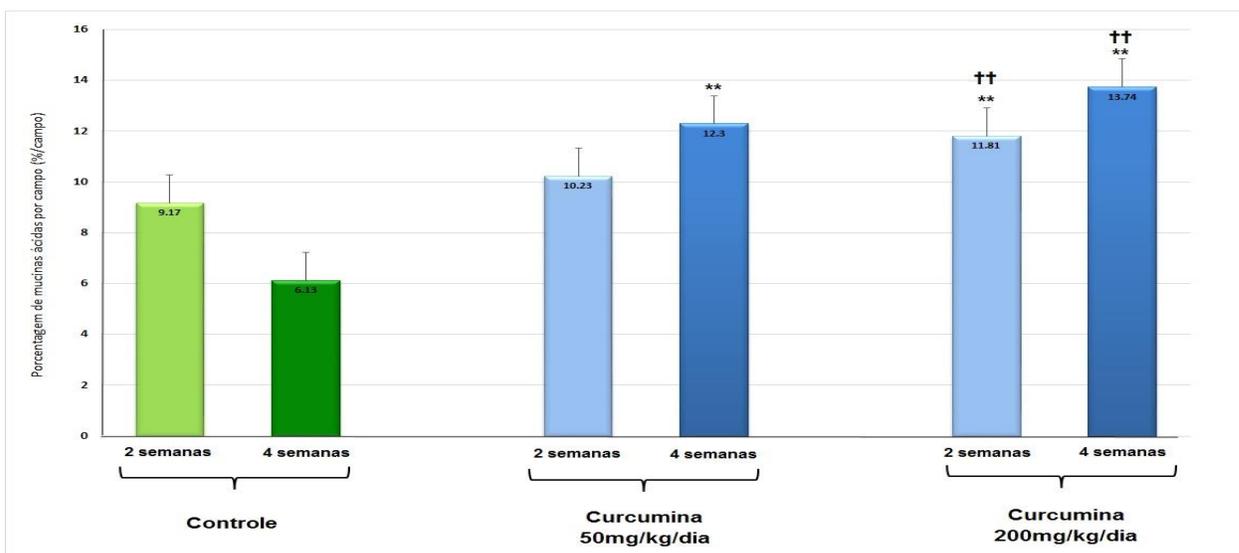
**FIGURA 10.** Epitélio cólico excluído sob irrigação de solução salina a 0,9% durante duas semanas (à esquerda) e quatro semanas (à direita). (HE 400x).

Nos grupos experimentais que tiveram a intervenção realizada com curcumina, na dosagem de 200 mg/kg.dia, conforme demonstrado na figura 11, durante o período de duas semanas e quatro semanas, observou-se o restabelecimento da estrutura epitelial da mucosa cólica excluída, devolvendo ao cólon o padrão de distribuição e organização das criptas cólicas bem como das células caliciformes, com quantificação significativa de mucinas ácidas ( $p < 0,01$ ).



**FIGURA 11.** Conteúdo tecidual de mucinas ácidas sob irrigação de curcumina, na dosagem de 200 mg/kg.dia, durante o período de duas semanas (à esquerda - HE 200x) e quatro semanas (à direita - HE 200x).

A figura 12 apresenta em forma quantitativa por campo a porcentagem de mucinas ácidas do grupo experimental, sob intervenção de S.F 0,9% e curcumina nas concentrações de 50 mg/kg.dia e 200 mg/kg.dia, durante o período de duas semanas e quatro semanas. Para estes resultados obtidos foi utilizado teste não-paramétrico de Mann-Whitney.



**FIGURA 12.** Porcentagem de mucinas ácidas por campo sob a intervenção com S.F 0,9% e curcumina nas concentrações de 50 mg/kg.dia e 200 mg/kg.dia, durante o período de duas semanas e quatro semanas. Teste de Mann-Whitney. \*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$ ; †  $p<0,05$ ; ††  $p<0,01$ .

No grupo controle, o conteúdo tecidual de mucinas ácidas reduz-se significativamente após a intervenção com S.F 0,9% por quatro semanas, quando comparado ao período de duas semanas ( $p<0,01$ ).

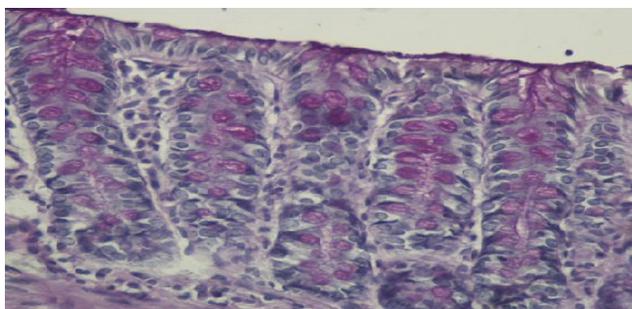
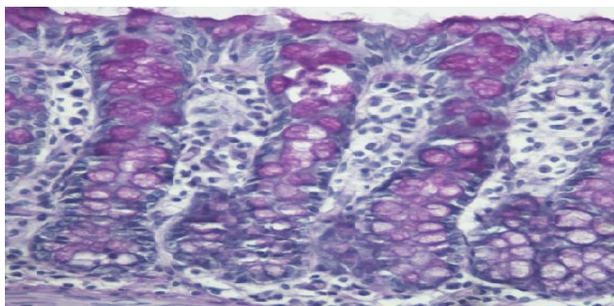
A irrigação com curcumina na dosagem de 50 mg/kg.dia, não aumentou a quantidade de mucinas ácidas no grupo experimental, comparando-se à irrigação com S.F 0,9% no grupo controle durante duas semanas do estudo ( $p=0,1523$ ). No entanto, na dosagem de 50 mg/kg.dia por quatro semanas houve um aumento significativo em relação ao grupo controle ( $p<0,01$ ).

Já na irrigação cólica do grupo experimental com curcumina a 200 mg/kg.dia, houve um significativo aumento do conteúdo de mucinas ácidas, quando comparada ao grupo controle, durante o tempo de duas e quatro semanas de estudo ( $p<0,01$ ).

Ao avaliar-se no grupo experimental a mucosa cólica exclusiva sob intervenção de curcumina na dosagem de 50 mg/kg.dia durante o período de duas e quatro semanas, foi possível identificar uma elevação da concentração de mucinas ácidas no tempo máximo de estudo ( $p<0,0044$ ). O mesmo ocorrera com a curcumina na dosagem de 200/kg/dia no grupo experimental ( $p<0,0028$ ).

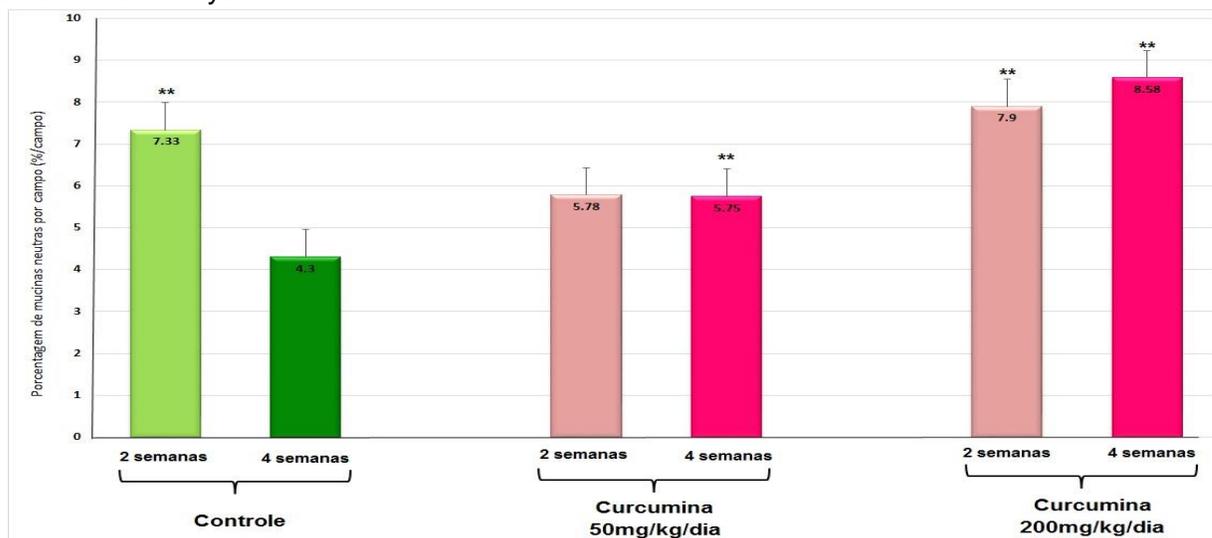
O conteúdo das mucinas ácidas foi maior com o uso de curcumina de 200 mg/kg.dia em relação com a dose de 50 mg/kg.dia durante duas e quatro semanas ( $p < 0,0101$ ). A curcumina também elevou a quantidade de mucinas ácidas com 200 mg/kg.dia no período de quatro semanas em comparação ao período de duas semanas ( $p < 0,0432$ ).

A figura 13 apresenta na microscopia o conteúdo das mucinas neutras do grupo experimental, com a intervenção de curcumina na dosagem de 200 mg/kg.dia, pelo período de duas e quatro semanas do estudo.



**FIGURA 13.** Conteúdo tecidual de mucinas neutras em epitélio cólico excuso sob irrigação de curcumina, na dosagem de 200mg, durante o período de duas (à esquerda - HE 200x) e quatro semanas (à direita - HE 200x).

A representação gráfica que quantificou o conteúdo de mucinas neutras em porcentagem por campo, é demonstrada na figura 14, nos grupos controle e experimental, sob intervenção de S.F a 0,9% e curcumina nas concentrações de 50 e 200 mg/kg.dia, durante o período de duas e quatro semanas. Os resultados obtidos foram submetidos a avaliação do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.



**FIGURA 14.** Porcentagem de mucinas neutras por campo sob a intervenção com S.F 0,9% e curcumina nas concentrações de 50 e 200 mg/kg.dia, durante o período de duas e quatro semanas. Teste de Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ .

A quantidade de mucinas neutras diminuiu no grupo experimental sob intervenção de curcumina na dosagem de 50 mg/kg.dia comparado ao grupo controle sob intervenção com S.F a 0,9%, durante o período de duas semanas ( $p=0,0003$ ).

O conteúdo de mucinas neutras não se modificou no grupo experimental em relação ao grupo controle após intervenção com 200 mg/kg.dia de curcumina no intervalo de duas semanas ( $p=0,1190$ ).

As mucinas neutras tiveram seu conteúdo aumentado quando quantificadas no grupo experimental em relação ao grupo controle, após intervenção com 50 mg/kg.dia de curcumina no período de quatro semanas de estudo ( $p=0,0010$ ). Na dose de 200 mg/kg.dia de curcumina no mesmo período descrito houve expressivo aumento de seu conteúdo quando comparadas a intervenção com S.F a 0,9% ( $p < 0,01$ ).

Comparou-se o conteúdo das mucinas neutras no grupo experimental com intervenção de 50 mg/kg.dia de curcumina durante duas e quatro semanas. Não houve modificação do conteúdo tecidual durante os períodos avaliados com a concentração de curcumina proposta ( $p=0.2170$ ).

Curcumina na concentração de 200 mg/kg.dia elevou a concentração tecidual de mucinas neutras dentro do grupo experimental, no período de duas semanas ( $p<0,01$ ) e quatro semanas ( $p<0,01$ ), comparados ao grupo controle.

Analisou-se o conteúdo de mucinas neutras após duas semanas e quatro semanas, comparando a intervenção com curcumina na concentração de 50 mg/kg.dia e 200 mg/kg.dia. O conteúdo de mucinas neutras elevou-se com o uso de 50 mg/kg.dia de curcumina nos dois grupos citados, em duas e quatro semanas ( $p<0,01$ ), porém sendo maior o aumento da concentração tecidual com o uso de 200 mg/kg.dia de curcumina em relação a utilização de 50 mg/kg.dia, no período de duas semanas e posteriormente em quatro semanas do presente estudo ( $p<0,01$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Margarido et al. (2003) demonstrou em estudos a utilização do modelo experimental de CCE, contribuindo para continuidade de pesquisas que na atualidade avaliam os processos etiopatogênicos encontrados na CE. Este modelo foi utilizado neste estudo.

Em 2008, Sousa et al. salientou a importância da utilização de um modelo experimental na colite de exclusão (CE), dado a sua grande relevância clínica, pela oportunidade de se avaliar possíveis propostas terapêuticas, através da administração tópica de substâncias com potencial anti-inflamatório, na prerrogativa de melhoria do processo inflamatório crônico, bem como do restabelecimento da camada protetora de muco epitelial.

No presente estudo, foi possível observar a acentuação do processo inflamatório na mucosa cólica do grupo controle com a intervenção de S.F a 0,9%, estabelecimento de abscessos e ulcerações a mucosa cólica excluída, sendo possível a avaliação do escore inflamatório instalado. E, quando a utilização da curcumina dentro do grupo experimental, observar melhorias, no processo inflamatório e reorganização do epitélio cólico.

Não obstante, Corfield et al. (2000) e Gaudier e Hoebler (2006) reconheceram a importância do muco intestinal como primeira linha de proteção a mucosa cólica. Felipe (1979) e posteriormente Pravda (2005) demonstraram que essa barreira epitelial apresenta em sua composição a predominância de glicoproteínas chamada de mucinas, que são produzidas e secretadas pelas células caliciformes nas criptas intestinais, apresentando direta relação com produção de muco intestinal e manutenção da defesa intestinal.

Estas mucinas podem apresentar alterações em sua composição, expressão e até mesmo em sua síntese devido ao fornecimento inadequado de substrato energético a mucosa cólica, como descrito por Augenlicht e Willemsen (2003).

Estudos mostraram que em patologias inflamatórias do trato gastrointestinal e em situações de exclusão de trânsito fecal ocorre importante redução do conteúdo de mucinas neutras e, particularmente, das mucinas ácidas (FILIPE, 1979; MIMURA et al., 1999; UCHIDA et al., 2001. CASTRO et al., 2006; NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009). O mesmo foi encontrado nos modelos do grupo controle do presente estudo.

Como a mucosa cólica possui composições distintas nos diferentes pontos do trato intestinal, não seria diferente que a expressão tecidual de mucinas ocorreria de forma singular ao longo do trânsito fecal, principalmente em colo distal, com predomínio de mucinas ácidas, produção de muco epitelial, armazenamento e progressão do conteúdo fecal (FILIPE, 1979, JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

Em 2009, Nonose descreveu os efeitos da CE na expressão tecidual de mucinas em mucosa intestinal, o que foi verificado no grupo controle, após duas semanas da confecção do estoma cirúrgico, com instilação de S.F a 0,9%, a redução da expressão tecidual de mucinas, principalmente das mucinas ácidas, reafirmando os resultados encontrados em literatura nos modelos experimentais de CE.

Segundo Almeida (2006), são descritos em diversas literaturas as propriedades terapêuticas que circundam o uso da curcumina, devido ao seu potencial efeito anti-inflamatório celular. Estudos recentes realizados por Chain (2014), Bonassa (2015) e Kaled (2016) demonstraram o efeito anti-inflamatório da curcumina em modelos experimentais de CE, com redução importante do processo degenerativo celular e recuperação da estrutura cólica exclusiva.

Pode-se observar nos grupos experimentais os efeitos da curcumina sobre o processo inflamatório no epitélio cólico, com elevação da expressão tecidual de mucinas que desenvolvem papel fundamental na composição do muco cólico e restabelecimento das barreiras de proteção da mucosa intestinal.

Na atualidade, existem poucos estudos sobre a administração de substâncias como controle em modelos experimentais de CE, referindo que intervenções experimentais com a utilização de S.F 0,9% não acentuam a inflamação da mucosa cólica exclusiva, portanto, não influenciando sobre a expressão tecidual de mucinas (MARGARIDO et al., 2003; NASRRI et al., 2008; HELMAN et al., 2008; CALTABIANO et al. 2010; MARQUES et al., 2010; CUNHA et al., 2011; MADALOSSO, 2011; ALMEIDA et al., 2012; PEREIRA et al., 2013). Utilizou-se nos animais do grupo controle, a aplicação de S.F 0,9% ao segmento cólico exclusivo.

Observou-se com significância os efeitos da curcumina nos grupos experimentais de CE, tanto nas concentrações iniciais (50 mg/kg.dia) quanto nas concentrações finais (200 mg/kg.dia), demonstrando o efeito redutor do processo inflamatório crônico existente na mucosa intestinal exclusiva, nos tempos de duas semanas e quatro semanas do estudo.

Ao avaliar-se as expressões teciduais de mucinas ácidas nos grupos experimentais sob a instilação de curcumina, comparados aos grupos controle sob intervenção de S.F a 0,9%, observou-se que já nas menores concentrações de curcumina (50 mg/kg.dia) houve quantificação da expressão das mucinas ácidas, com aumento significativo da expressão tecidual quando utilização de curcumina na maior concentração (200 mg/kg.dia).

Nas mucinas neutras, observou-se expressão significativa tecidual ao se utilizar a concentração máxima de curcumina (200 mg/kg.dia), em relação controle com S.F a 0,9%, sendo que não houve mudança na quantificação de expressão tecidual quando utilizado curcumina em sua menor concentração (50 mg/kg.dia).

Com este estudo pode-se demonstrar que a quantificação da expressão tecidual de mucinas ácidas e neutras apresentam relação direta com a concentração de curcumina utilizada. De igual forma, pode ser visto que a expressão tecidual de mucinas também se modificou de acordo com o tempo, em cada grupo do estudo.

As expressões teciduais de mucinas ácidas na mucosa cólica exclusiva, no período de duas semanas, apresentaram diminuição de sua quantificação no grupo controle, e que esta diminuição foi acentuada no período de quatro semanas de estudo. O mesmo ocorreu com as mucinas neutras nos períodos acima descritos.

Nas mucinas neutras, foi verificado que mesmo após intervenção no grupo experimental com 50 mg/kg.dia de curcumina, durante o período de duas semanas e quatro semanas, não ocorreram mudanças da expressão tecidual em relação aos grupos controle nos tempos descritos anteriormente. Utilizando 200 mg/kg.dia de curcumina, quantificou-se a expressão de mucina neutras dentro do grupo experimental com significância, no período de duas semanas, com elevação do conteúdo tecidual em quatro semanas, comparados aos grupos controle no mesmo período de avaliação.

As mucinas ácidas apresentaram assim como as mucinas neutras diminuição de sua expressão em mucosa intestinal nos grupos controle, no período de duas semanas, acentuando-se no período de quatro semanas do estudo.

As mucinas ácidas foram quantificadas em sua expressão na utilização de 50 mg/kg.dia de curcumina apenas no tempo de quatro semanas de estudo, não sendo verificado aumento de conteúdo tecidual durante duas semanas de intervenção. Houve significativo aumento do conteúdo de expressão de mucinas ácidas após intervenção com curcumina em 200 mg/kg.dia, no tempo de duas e quatro semanas nos grupos experimentais em equiparação aos grupos controle.

Finalizando o estudo, pode-se concluir que a CE em modelos experimentais acentua progressivamente a diminuição da expressão tecidual de mucinas, principalmente das mucinas ácidas, resultado este também verificado por Nonose (2009).

A justificativa para este padrão de ocorrência é possível quando correlacionamos a expressão tecidual de mucinas em mucosa cólicas providas de trânsito, observando que as mucinas ácidas são encontradas em segmentos cólicos distais, possuindo a função de armazenamento e progressão fecal através da manutenção do muco cólico. Como na CE ocorre diminuição progressiva do muco cólico através do processo inflamatório crônico da mucosa intestinal, isto acarretaria em diminuição da expressão tecidual de mucinas ácidas.

Portanto, foi possível pelo presente estudo correlacionar a expressão tecidual de mucinas, primeiramente ao tempo de derivação cólica e posteriormente à intervenção pela aplicação de

curcumina em diferentes concentrações, sendo tal resultado de suma importância a literatura científica devido aos poucos estudos envolvendo o uso de substâncias de poderio anti-inflamatório à modelos experimentais de CE, possibilitando assim o estudo de uma promissora terapêutica aos portadores de CE.

## 6. CONCLUSÃO

- A curcumina na dosagem de 200 mg/kg.dia durante duas semanas e quatro semanas e na dosagem de 50 mg/kg.dia durante quatro semanas, reduziu o processo inflamatório em relação ao grupo controle nos segmentos cólicos desprovidos de transito intestinal em modelo experimental de CE.
- A quantificação do conteúdo das mucinas ácidas na mucosa cólica exclusiva aumentou após a realização de enemas diários contendo 50 mg/kg.dia de curcumina no grupo experimental, quando comparadas ao grupo controle instilado com soro fisiológico a 0,9% durante o período de quatro semanas do estudo.
- A curcumina aumentou o conteúdo de mucinas ácidas na mucosa cólica exclusiva do grupo experimental quando instilada na concentração de 200 mg/kg.dia em comparação ao grupo experimental instilado com 50 mg/kg.dia, durante o período de duas e quatro semanas.
- A quantificação do conteúdo de mucinas neutras e ácidas na mucosa cólica exclusiva aumentou após a realização de enemas diários 200mg/kg de curcumina no grupo experimental, quando comparadas ao grupo controle instilado com soro fisiológico a 0,9% durante o período de duas e quatro semanas do estudo.
- A curcumina aumentou o conteúdo de mucinas neutras na mucosa cólica exclusiva do grupo experimental quando instilada na concentração de 200 mg/kg.dia em comparação ao grupo experimental instilado com 50 mg/kg.dia, durante o período de quatro semanas.
- A curcumina demonstrou importante papel como redutor do processo inflamatório tecidual na mucosa cólica exclusiva, apresentando-se como uma potencial e promissora proposta terapêutica dentro da CCE.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, V.P.; SCHIMMEL, E.M. Diversion colitis: a nutritional deficiency syndrome? **Nutr Rev**, v. 47, n. 9, p. 257-261, 1989.

ALMALOUF, P; SHEHAB, T.M; DANIEL, A.M; ROBINSON, E.A; BARNETT, J.L. Therapeutic hydrogen peroxide enema causing severe acute colitis. **Int J Colorectal Dis**, v.23, n.11, p. 1139-1140, 2008.

ALMEIDA, L.P. **Caracterização de pigmentos da *Curcuma longa* L. Avaliação da atividade antimicrobiana, morfogênese *in vitro* na produção de curcuminóides e óleos essenciais.** 2006. 120 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006.

ARAFI, H.M.; HEMEIDA, R.A.; EL-BAHRAWY, A.I.; HAMADA, F.M. Prophylactic role of curcumin in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis murine model **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 6, p. 1311-1317, 2009.

BALIGA, M.S.; JOSEPH, N.; VENKATARANGANNA, M.V.; SAXENA, A.; PONEMONE, V.; FAYAD, R. Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations. **Food Funct**, v. 3, n. 11, p. 1109-1117, 2012.

BILLEREY-LARMONIER, C.; UNO, J.K.; LARMONIER, N.; MIDURA, A.J.; TIMMERMANN, B.; GHISHAN, F.K.; KIELA, P.R. Protective effects of dietary curcumin in mouse model of chemically induced colitis are strain dependent. **Inflamm Bowel Dis**, v. 14, n. 6, p. 780-793, 2008.

BRUMATTI, L.V.; MARCUZZI, A.; TRICARICO, P.M.; ZANIN, V.; GIRADELLI, M.; BIANCO, A.M. Curcumin and inflammatory bowel disease: potential and limits of innovative treatments. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 21127-21153, 2014.

CADENAS, E.; DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Rad Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 222-230, 2000.

CALTABIANO, C. **Avaliação dos efeitos do ácido 5-aminosalicílico contra o dano oxidativo ao DNA na colite de exclusão.** 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista. 2010.

CAMMAROTA, G; CESARO, P; CAZZATO, A; FEDELI, P; RICCIONI, M.E; SPARANO, L. Hydrogen peroxide-related colitis (previously known as "pseudolipomatosis"): a series of cases occurring in an epidemic pattern. **Endoscopy**, v. 39, n.10, p. 916-919, 2007.

CETINKAYA, A.; BULBULOGLU, E.; KURUTAS, E.B.; CIRALIK, H.; KANTARCEKEN, B.; BUYUKBESE, M.A. Beneficial effects of n-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. **Tohoku J Exp Med**, v. 206, n. 2, p. 131-139, 2005.

CHAIM, F.D.M. **Avaliação do conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas na mucosa cólica excluída de trânsito intestinal submetida à aplicação de enemas com sucralfato.** 2014. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2014.

CHAIM, F.M.; SATO, D.T.; RODRIGUES, M.R.; DIAS, A.M; SILVEIRA JÚNIOR, P.P.; PEREIRA, J.A.; MARTINEZ, C.A. Evaluation of the application of enemas containing sucralfate in tissue content of neutral and acid mucins in experimental model of diversion colitis. **Acta Cir Bras**, v. 29, n. 9, p. 544-552, 2014.

CHANDRA, D.; GUPTA, S.S. Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of volatile oil of *Curcuma longa* (Haldi). **Indian J Med Res**, v. 60, n. 1, p. 138-142, 1972.

CHRISTL, S.U.; EISNER, H.D.; DUSEL, G.; KASPER, H.; SCHEEPACH, W. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. **Dig Dis Sci**, v. 41, n. 12, p. 2477-2481, 1996.

CORFIELD, A.P; MYERSCOUGH, N; LONGMAN. R; SYLVESTER, P; ARUL, S; PIGNATELLI, M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. **Gut**, v. 47, n. 4, p. 589-594, 2000.

CUNHA, F.L.; SILVA, C.M.; ALMEIDA, M.G.; LAMEIRO, T.M.; MARQUES, L.H.; MARGARIDO, N.F.; MARTINEZ, C.A. Reduction in oxidative stress levels in the colonic mucosa without fecal stream after the application of enemas containing aqueous *Ilex paraguariensis* extract. **Acta Cir Bras**, v. 26, n. 4, p. 289-296, 2011.

DEGUCHI, Y.; ANDOH, A.; INATOMI, O.; YAGI, Y.; BAMBA, S.; ARAKI, Y.; HATA, K.; TSUJIKAWA, T.; FUJIYAMA, Y. Curcumin prevents the development of dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis **Dig Dis Sci**, v. 52, n. 11, p. 2993-2998, 2007.

FARRELL, R.F; PEPPERCORN, M.A. Ulcerative colitis. **Lancet**, v. 359, p.331-340, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Bras**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FILIFE, M.I. Mucins in the human gastrointestinal epithelium: a review. **Invest Cell Pathol**, v. 2, n. 3, p.195-216, 1979.

FILLMANN, H; KRETZMANN, N.A; SAN-MIGUEL, B; LLESUY, S; MARRONI, N; GONZÁLEZGALLEGO, J. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. **Toxicology**, v. 236, n. 3, p. 217-226, 2007.

FINNIE, I.A; DWARAKANATH, A.S; TAYLOR, B.A; RHODES, J.M. Colonic mucins synthesis is increased by sodium butyrate. **Gut**, v. 36, p. 93-99, 1995.

FRANKEL, W; LEW, J; SU, B; BAIN, A; KLURFELD, D; EINHORN, E; MACDERMOTT, R.P; ROMBEAU, J. Butyrate increases colonocyte protein synthesis in ulcerative colitis. **J Surg Res**, v. 57, n. 1, p. 210-214, 1994.

GAUDIER, E; HOEBLER, C. Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity. **Gastroenterol Clin Biol**, v. 30, n. 8, p. 965-974, 2006.

GENDLER, S.J; SPICER, A.P. Epithelial mucin genes. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 607-634, 1995.

GERAGHTY, J.M.; TALBOT, I.C. Diversion colitis: histological features in the colon and rectum after defunctioning colostomy. **Gut**, v. 32, n. 9, p.1020-1023, 1991.

GLOTZER, D.J.; GLICK, M.E.; GOLDMAN, H. Proctitis following diversion of fecal stream. **Gastroenterology**, v. 80, n. 3, p. 438-441, 1981.

GOLD, D.V; SHOCHAT, D; MILLER, F. Protease digestion of colonic mucin. Evidence for the existence of two immunochemically distinct mucins. **J Biol Chem**, v. 256, n. 12, p. 6354-6358, 1981.

GOLDMAN, H; MING, S.C. Mucins in normal and neoplastic gastrointestinal epithelium. Histochemical distribution. **Arch Pathol**, v. 85, p. 580-586, 1968.

GUPTA, S.C.; KISMALI, G.; AGGARWAL, B.B. Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 2-13, 2013.

HABR-GAMA, A; TEIXEIRA, M.G; VIEIRA, M.J.F; MILÉU, L.F; LAURINO-NETO, R; PINOTTI, H.W. Operação de Hartmann e suas conseqüências. **Rev bras Coloproctol**, v. 17, n. 1, p. 5-10, 1997.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**, v. 246, n. 2, p. 501-514, 1986.

HARIG, J.M.; SOERTEL, K.H.; KOMOROWSKI, R.A.; WOOD, C.M. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. **N Engl J Med**, v. 320, n. 1, p. 23-28, 1989.

HENDRICKSON, B.A.; GOKHALE, R.; CHO, J.H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 1, p. 79-94, 2002.

HOFFMANN, J.C.; PAWLOWSKI, N.N.; KUHL, A.A.; HOHNE, W.; ZEITZ, M. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. **Pathobiology**, v. 70, n. 3, p. 121-130, 2003.

JIANG, H.; DENG, C.S.; ZHANG, M.; XIA, J. Curcumin-attenuated trinitrobenzene sulphonic acid induces chronic colitis by inhibiting expression of cyclooxygenase-2 **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 24, p. 3848-3853, 2006.

JORGENSEN, J.R; CLAUSEN, M.R; MORTENSEN, P.B. Oxidation of short and medium chain C2-C8 fatty acids in Sprague-Dawley rat colonocytes. **Gut**, v. 40, n. 3, p. 400-405, 1997.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 11ed., cap.15, p.283-316, 2008.

JURENKA, J.S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. **Alternative Medicine Review**, v. 14, n. 2, p. 141-153, 2009.

KELI, E.; BOUCHOUCHA, M.; DEVROEDE, G.; CARNOT, F.; OHRANT, T.; CUGNENC, P.H. Diversion-related experimental colitis in rats. **Dis Colon Rectum**, v. 40, n. 2, p. 222-228, 1997.

KIELY, E.M.; AJAYI, N.A.; WHEELER, R.A.; MALONE, M. Diversion procto-colitis: response to treatment with short-chain fatty acids. **J Pediatr Surg**, v. 36, n. 10, p. 1514-1517, 2001.

KISSMEYER-NIELSEN, P; CHRISTENSEN, H; LAURBERG, S. Diverting colostomy induces mucosal and muscular atrophy in rat distal colon. **Gut**, v. 35, n. 9, p.1275-1281, 1994.

KOMOROWSKI, R.A. Histologic spectrum of diversion colitis. **Am J Sur Pathol**, v. 14, n. 6, p. 548-554, 1990.

KOOSIRIRAT, C.; LINPISARN, S.; CHANGSOM, D.; CHAWANSUNTATI, K.; WIPASA, J. Investigation of the anti-inflammatory effect of *Curcuma longa* in *Helicobacter pylori*-infected patients. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 7, p. 815-818, 2010.

KUMAR, S.; AHUJA, V.; SANKAR, M.J.; KUMAR, A.; MOSS, A.C. Curcumin for maintenance of remission in ulcerative colitis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 17, n. 10, p. 1465-1858, 2012.

LANGHORST, J.; WULFERT, H.; LAUCHE, R.; KLOSE, P.; CRAMER, H.; DOBOS, G.J.; KORZENIK, J. Systematic review of complementary and alternative medicine treatments in inflammatory bowel diseases. **J Crohns Colitis**, v. 9, n. 1, p. 86-106, 2015.

LARMONIER, C.B.; MIDURA-KIELA, M.T.; RAMALINGAM, R.; LAUBITZ, D.; JANIKASHVILI, N.; LARMONIER, N.; GHISHAN, F.K.; KIELA, P.R. Modulation of neutrophil motility by curcumin: implications for inflammatory bowel disease **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 2, p. 503-515, 2011.

LARMONIER, C.B.; UNO, J.K.; LEE, K.M.; KARRASCH, T.; LAUBITZ, D.; THURSTON, R.; MIDURA-KIELA, M.T.; GHISHAN, F.K.; SARTOR, R.B.; JOBIN, C.; KIELA, P.R. Limited effects of dietary curcumin on Th-1 driven colitis in IL-10 deficient mice suggest an IL-10-dependent mechanism of protection. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 295, n. 5, p. 1079-1091, 2008.

LEPPI, T.J; SPICER, S.S. The histochemistry of mucins in certain primate salivary glands. **Am J Anat**, v. 118, n. 3, p. 833-859, 1966.

LIU, Q.; SHIMOYAMA, T.; SUZUKI, K.; UMEDA, T.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Effect of sodium butyrate on reactive oxygen species generation by human neutrophils. **Scand J Gastroenterol**, v. 36, n. 7, p. 744-750, 2001.

LOPES, P.F. Alterações estruturais na mucosa do cólon derivado. Estudo estereológico experimental em ratos. **Rev bras Coloproct**, v. 22, n. 3, p. 164-169, 2002.

LU, E.S; LIN, T; HARMS, B.L; GAUMNITZ, E.A; SINGARAM. C. A severe case of diversion colitis with large ulcerations. **Am J Gastroenterol**, v. 90, n. 9, p. 1508-1510, 1995.

LUBBAD, A.; ORIOWO, M.A.; KHAN, I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. **Mol Cell Biochem**, v. 322, n. 1-2, p. 127-135, 2009a.

LUBBAD, A.S.; ORIOWO, M.A.; KHAN, I. Curcumin reverses attenuated carbachol-induced contraction of the colon in a rat model of colitis. **Scand J Gastroenterol**, v. 44, n. 2, p.187-194, 2009b.

MANDAL, M.N.; PATLOLLA, J.M.; ZHENG, L.; AGBAGA, M.P.; TRAN, J.T.; WICKER, L.; KASUS-JACOBI, A.; ELLIOTT, M.H.; RAO, C.V.; ANDERSON, R.E. Curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 5, p. 672-679, 2009.

MARQUES, L.H.S.; SILVA, C.M.G.; LAMEIRO, T.M.M; ALMEIDA, M.G.; CUNHA, F.L.; PEREIRA, J.A.; MARTINEZ, C.A.R. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica em células da mucosa cólica após aplicação de enemas com peróxido de hidrogênio: estudo experimental em ratos. **Rev bras. colo-proctol**, v. 30, n. 3, p. 272-280, 2010.

MARTINEZ, C.A.; DE ALMEIDA, M.G.; DA SILVA, C.M.; RIBEIRO, M.L.; DA CUNHA, F.L.; RODRIGUES, M.R.; SATO, D.T.; PEREIRA, J.A. Enemas with N-acetylcysteine can reduce the level of oxidative damage in cells of the colonic mucosa diverted from the faecal stream. **Dig Dis Sci**, v. 58, n. 12, p. 3452-3459, 2013.

MARTINEZ, C.A.R; NONOSE, R; MARGARIDO, N.F; SPADARI, A.P.P; PEREIRA, J.A; PRIOLLI, D.G; MÁXIMO, F.R. Quantificação da expressão de mucinas na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. **Rev bras Coloproct**, v. 28, n. 1, p. 47-48, 2008.

MARTINEZ, C.A.R.; RIBEIRO, M.L.; GAMBERO, A.; MIRANDA, D.D.C.; PEREIRA, J.A.; NADAL, S.R. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. **Acta Cir Bras**, v. 25, n. 5, p. 387-395, 2010b.

MARTINEZ, C.A.R.; RODRIGUES, M.R.; SATO, D.T.; SILVA, C.M.G.; KANNO, D.T.; MENDONÇA, R.L.S.; PEREIRA, J.A. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant effects of the sucralfate in diversion colitis. **J. Coloproctol. (Rio J.)**, v. 35, n. 2, p. 90-99, 2015.

MAY, A.; CECÍLIO FILHO, A.B.; CAVARIANNI, R.L.; BARBOSA, J.C. Desenvolvimento e produtividade da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em função de doses de nitrogênio e potássio. **Rev Bras PI Med**, v. 7, n. 3, p. 1-7, 2005.

MELLO, R.O.; FONTE, F.P.; DA SILVA, C.M.G.; MARGARIDO, N.F.; MARTINEZ, C.A.R. Evaluation of the number of goblet cells in crypts of the colonic mucosa with and without fecal transit. **Rev Col Bras Cir**, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2012.

MIDURA-KIELA, M.T.; RADHAKRISHNAN, V.M.; LARMONIER, C.B.; LAUBITZ, D.; GHISHAN, F.K.; KIELA, P.R. Curcumin inhibits interferon- $\gamma$  signaling in colonic epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 302, n. 1, p. 85-96, 2012.

MILLAR, A.D.; RAMPTON, D.S.; CHANDER, C.L.; CLAXSON, A.W.; BLADES, S.; COUMBE, A.; PANETTA, J.; MORRIS, C.J.; BLAKE, D.R. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. **Gut**, v. 39, n. 3, p. 407-415, 1996.

MIMURA, T; KURAMOTO, S; YAMASAKI, K; KAMINISHI, M. Familial adenomatous polyposis: a case report and histologic mucin study. **J Clin Gastroenterol**, v. 28, n. 4, p. 372-376, 1999.

MOEINIAN, M.; GHASEMI-NIRI, S.F.; MOZAFFARI, S.; ABDOLGHAFFARI, A.H.; BAEERI, M.; NAVAEA-NIGJEH, M.; ABDOLLAHI, M. Beneficial effect of butyrate, *Lactobacillus casei* and L-carnitine combination in preference to each in experimental colitis. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 31. p. 10876-10885, 2014.

MORTENSEN, P.B.; CLAUSEN, M.R. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v. 216, p. 132-148, 1996.

MOURTAS, S.; LAZAR, A.N.; MARKOUTSA, E.; DUYCKAERTS, C.; ANTIMISIARIS, S.G. Multifunctional nanoliposomes with curcumin-lipid derivative and brain targeting functionality with potential applications for Alzheimer disease. **Eur J Med Chem**, v. 80, p. 175-183, 2014.

MOUZAOU, S.; RAHIM, I.; DJERDJOURI, B. Aminoguanidine and curcumin attenuated tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced oxidative stress, colitis and hepatotoxicity in mice. **Int Immunopharmacol**, v. 12, n. 1, p. 302-311, 2012.

MUKHERJEE, S.; MAZUMDAR, M.; CHAKRABORTY, S.; MANNA, A.; SAHA, S.; KHAN, P.; BHATTACHARJEE, P.; GUHA, D.; ADHIKARY, A.; MUKHERJEE, S.; DAS, T. Curcumin inhibits breast cancer stem cell migration by amplifying the E-cadherin/beta-catenin negative feedback loop. **Stem Cell Res Ther**, v. 5, n. 5, p. 116, 2014.

MURAKAMI, A.; FURUKAWA, I.; MIYAMOTO, S.; TANAKA, T.; OHIGASHI, H. Curcumin combined with turmerones, essential oil components of turmeric, abolishes inflammation-associated mouse colon carcinogenesis. **Biofactors**, v. 39, n. 2, p. 221-232, 2013.

MURRAY, F.; O'BRIEN, M.J.; BIRKETT, D.H.; KENNEDY, S.M.; LA MONT, J.T. Diversion colitis: pathologic findings in a resected sigmoid colon and rectum. **Gastroenterology**, v. 93, n. 6, p. 1404-1408, 1987.

NASSRI, C.G.G.; NASRRI, A.B.; FAVERO, E.; ROTTA, C.M.; MARTINEZ, C.A.R.; MARGARIDO, N.F. Influência da irrigação de soluções nutricionais no colo excluído de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. **Rev bras Coloproct**, v. 28, n. 3, p. 306-314, 2008.

NEERATI, P.; DEVDE, R.; GANGI, A.K. Evaluation of the effect of curcumin capsules on glyburide therapy in patients with type-2 diabetes mellitus **Phytother Res**, v. 28, n. 12, p. 1796-800, 2014.

NEUT, C; GUILLEMOT, F; GOWER-ROUSSEAU, C; BIRON, N; CORTOT, A; COLOMBEL, J.F. Treatment of diversion colitis with short-chain fatty acids. Bacteriological study. **Gastroenterol Clin Biol**, v. 19, n. 11, p. 871-875, 1995.

NEUT, C; GUILLEMOT, F; COLOMBEL, J.F. Nitrate-reducing bacteria in diversion colitis: a clue to inflammation? **Dig Dis Sci**, v. 42, n. 12, p. 2577-2580, 1997.

NONOSE, N. **Avaliação dos efeitos da curcumina na fase aguda da artrite induzida por zimosan estudo experimental em ratos. 2011. 105 f.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2011.

NONOSE, N.; PEREIRA, J.A.; MACHADO, P.R.; RODRIGUES, M.R.; SATO, D.T.; MARTINEZ, C.A. Oral administration of curcumin (*Curcuma longa*) can attenuate the neutrophil inflammatory response in zymosan-induced arthritis in rats. **Acta Cir Bras**, v. 29, n. 11, p. 727-734, 2014.

NONOSE, R. **Quantificação da expressão tecidual de mucinas na colite de exclusão: estudo experimental em ratos. 2009. 127 f.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2009.

NONOSE, R.; SPADARI, A.P.P.; PRIOLLI, D.G.; MÁXIMO, F.R.; PEREIRA, J.A.; MARTINEZ, C.A.R. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream in rats. **Acta Cir Bras**, v. 24, n. 4, p. 267-275, 2009.

OLIVEIRA, A.J.; PINTO JÚNIOR, F.E.; FORMIGA, M.C.; MELO, S.P.; BRANDÃO-NETO, J.; RAMOS, A.M. Comparison of prophylactic and therapeutic use of short-chain fatty acid enemas in diversion colitis: a study in Wistar rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 65, n. 12, p. 1351-1356, 2010.

OLIVEIRA-NETO, J.P.; AGUILAR-NASCIMENTO, J.E. Intraluminal irrigations with fibers improves mucosal inflammation and atrophy in diversion colitis. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 197-199, 2004.

ONA, F.V.; BOGER, J.N. Rectal bleeding due to diversion colitis. **Am J Gastroenterol**, v. 80, n. 1, p. 40-41, 1985.

PACHECO, R.G.; ESPOSITO, C.C.; MÜLLER, L.C.; CASTELO-BRANCO, M.T.; QUINTELLA, L.P.; CHAGAS, V.L.; DE SOUZA, H.S.; SCHANAIDER, A. Use of butyrate or glutamine in enema solution reduces inflammation and fibrosis in experimental diversion colitis **World J Gastroenterol**, v.18, n. 32, p. 4278-4287, 2012.

PANAHI, Y.; RAHIMNIA, A.R.; SHARAFI, M.; ALISHIRI, G.; SABURI, A.; SAHEBKAR, A. Curcuminoid treatment for knee osteoarthritis: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Phytother Res**, v. 28, n. 11, p. 1625-1631, 2014.

PEREIRA, J.A.; RODRIGUES, M.R.; SATO, D.T.; SILVEIRA JUNIOR, P.P.; DIAS, A.M.; SILVA, C.G.; MARTINEZ, C.A.R. Evaluation of sucralfate enema in experimental diversion colitis. **J Coloproctol (Rio J.)**, v. 33, n. 4, p. 182-190, 2013.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; FICHNA, J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 387, n. 7, p. 605-620, 2014.

PRAVDA, J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 16, p. 2371-2384, 2005.

ROEDIGER, W.E. The starved colon – diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis. **Dis Colon Rectum**, v. 33, n. 10, p. 858-862, 1990.

ROEDIGER, W.E.; NANCE, S. Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. **Br J Exp Pathol**, v. 67, n. 6, p. 773-782, 1986.

SAKATA T, VON ENGELHARDT W. Luminal mucin in the large intestine of mice, rats and guinea pigs. **Cell Tissue Res**, v. 219, n. 3, p. 629-635, 1981.

SALH, B.; ASSI, K.; TEMPLEMAN, V.; PARHAR, K.; OWEN, D.; GÓMEZ-MUÑOZ, A.; JACOBSON, K. Curcumin attenuates DNB-induced murine colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 285, n. 1, p. 235-243, 2003.

SAMUHASANEETO, S.; THONG-NGAM, D.; KULAPUTANA, O.; SUYASUNANONT, D.; KLAIKEAW, N. Curcumin decreased oxidative stress, inhibited NF-kappaB activation, and

improved liver pathology in ethanol-induced liver injury in rats. **J Biomed Biotechnol**, v. 10, n. 11, p. 963-981, 2009.

SAREEN, R.; NATH, K.; JAIN, N.; DHAR, K.L. Curcumin loaded microsponges for colon targeting in inflammatory bowel disease: fabrication, optimization, and in vitro and pharmacodynamic evaluation. **Biomed Res Int**, v. 10, p. 55-62, 2014.

SCHEPPACH, W.; CHRISTL, S.U.; BARTRAN, H.P.; RICHTER, F.; KASPER, H. Effects of short-chain fatty acids on the inflamed colonic mucosa. **Scand J Gastroenterol**, v. 222, p. 53-57, 1997.

SERIL, D.N.; LIAO, J.; YANG, G.Y.; YANG, C.S. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 3, p. 353-362, 2003.

SHAKIBAEI, M.; MOBASHERI, A.; LUEDERS, C.; BUSCH, F.; SHAYAN, P.; GOEL, A. Curcumin enhances the effect of chemotherapy against colorectal cancer cells by inhibition of NF- $\kappa$ B and Src protein kinase signaling pathways. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. 57-218, 2013.

SHEEHAN, J.; BRYNJOLFSSON, G. Ulcerative colitis following hydrogen peroxide enema. **Lab Invest**, v. 9, p. 150-167, 1960.

SHERIDAN, A.M.; FITZPATRICK, S.; WANG, C.; WHEELER, D.C.; LIEBERTHAL, W. Lipid peroxidation contributes to hydrogen peroxide induced cytotoxicity in renal epithelial cells. **Kidney Int**, v. 49, n. 1, p. 88-93, 1996.

SIES, H. Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 289, n. 13, p. 8735-8741, 2014.

SINGLA, V.; PRATAP MOULI, V.; GARG, S.K.; RAI, T.; CHOUDHURY, B.N.; VERMA, P.; DEB, R.; TIWARI, V.; ROHATGI, S.; DHINGRA, R.; KEDIA, S.; SHARMA, P.K.; MAKHARIA, G.; AHUJA, V. Induction with NCB-02 (curcumin) enema for mild-to-moderate distal ulcerative colitis - a randomized, placebo-controlled, pilot study. **J Crohns Colitis**, v. 8, n. 3, p. 208-214, 2014.

SOERGEL, K.H. Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. **Clin Investig**, v. 72, n. 10, p. 742-748, 1994.

SOUSA, M.V. **Avaliação das alterações histopatológicas da parede cólica na colite de exclusão: estudo experimental em ratos**. 2009. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2009.

SOUZA, M.V.; PRIOLLI, D.G.; PORTES, A.V.; CARDINALLI, I.A.; PEREIRA, J.A.; MARTINEZ, C.A.R. Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. **Acta Cir Bras**, v. 23, n. 5, p. 417-424, 2008.

SUGIMOTO, K.; HANAI, H.; TOZAWA, K.; AOSHI, T.; UCHIJIMA, M.; NAGATA, T.; KOIDE, Y. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 123, n. 6, p. 1912-1922, 2002.

THAM, D.M.; WITHIN, J.C.; COHEN, H.J. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodio sulfate-induced experimental colitis. **Pediatric Res**, v. 51, n. 5, p. 641-646, 2002.

TRIANAFILLIDIS, J.K.; NICOLAKIS, D.; MOUNTANEAS, G.; POMONIS, E. Treatment of diversion colitis with 5 aminosalicylic acid enemas: comparison with betamethasone enemas. **Am J Gastroenterol**, v. 86, n. 10, p. 1552-1553, 1991.

TRIPODI, J.; GORCEY, S.; BURAKOFF, R. A case of diversion colitis treated with 5-aminosalicylic acid enemas. **Am J Gastroenterol**, v. 87, n. 5, p. 645-647, 1992.

UKIL, A.; MAITY, S.; KARMAKAR, S.; DATTA, N.; VEDASIROMONI, J.R.; DAS, P.K. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. **Br J Pharmacol**, v. 139, n. 2, p. 209-218, 2003.

UNG, V.Y.; FOSHAUG, R.R. MACFARLANE, S.M.; CHURCHILL, T.A.; DOYLE, J.S.; SYDORA, B.C.; FEDORAK, R.N. Oral administration of curcumin emulsified in carboxymethyl cellulose has a potent anti-inflammatory effect in the IL-10 gene-deficient mouse model of IBD. **Dig Dis Sci**, v. 55, n. 5, p. 1272-1277, 2010.

VASINA, V; BROCCOLI, M; URSINO, M.G; BELLOT, S.F; SOLETI, A; PAOLINI, M. Effects of the nonpeptidyl low molecular weight radical scavenger IAC in DNBS-induced colitis in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 614, n. 1, p. 137-145, 2009.

VECCHI BRUMATTI, L.; MARCUZZI, A.; TRICARICO, P.M.; ZANIN, V.; GIRARDELLI, M.; BIANCO, A.M. Curcumin and inflammatory bowel disease: potential and limits of innovative treatments. **Molecules**, v. 19, n. 12, p.21127-21153, 2014.

VELAZQUEZ, O.C.; LEDERER, H.M.; ROMBEAU, J.L. Butyrate and colonocyte. Production, absorption, metabolism and therapeutic implications. **Adv Exp Med Biol**, v. 427, p. 123-134, 1997.

VENKATARANGANNA, M.V.; RAFIQ, M.; GOPUMADHAVAN, S.; PEER, G.; BABU, U.V.; MITRA, S.K. NCB-02 (standardized Curcumin preparation) protects dinitrochlorobenzene-induced colitis through down-regulation of NFkappa-B and iNOS. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 7, p. 1103-1107, 2007.

VILLANACCI, V; TALBOT, I.C; ROSSI, E; BASSOTTI, G. Ischaemia: a pathogenetic clue in diversion colitis? **Colorectal Dis**, n. 9, v. 7, p. 601-605, 2007.

VILLEGAS, I.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; DE LA LASTRA, C.A. Chemopreventive effect of dietary curcumin on inflammation-induced colorectal carcinogenesis in mice. **Mol Nutr Food Res**, v. 55, n. 2, p. 259-267, 2011.

WANG, P.; SU, C.; LI, R.; WANG, H.; REN, Y.; SUN, H.; YANG, J.; SUN, J.; SHI, J.; TIAN, J.; JIANG, S. Mechanisms and effects of curcumin on spatial learning and memory improvement in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. **J Neurosci Res**, v. 92, n. 2, p. 218-231, 2014.

WHELAN, R.L.; ABRAMSON, D.; KIM, D.S.; HASHMI, H.F. Diversion colitis: a prospective study. **Surg Endosc**, v. 8, n. 1, p. 19-24, 1994.

WILLEMSEN, L.E.; KOETSIER, M.A.; VAN DEVENTER, S.J.; VAN TOL, E.A. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E1 and E2 production by intestinal myofibroblasts. **Gut**, v. 52, n. 10, p. 1442-1447, 2003.

YADAV, V.R.; SURESH, S.; DEVI, K.; YADAV, S. Effect of cyclodextrin complexation of curcumin on its solubility and antiangiogenic and anti-inflammatory activity in rat colitis model. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 752-762, 2009.

YANG, J.Y.; ZHONG, X.; YUM, H.W.; LEE, H.J.; KUNDU, J.K.; NA, H.K.; SURH, Y.J. Curcumin inhibits STAT3 signaling in the colon of dextran sulfate sodium-treated mice. **J Cancer Prev**, v. 18, n. 2, p. 186-191, 2013.

YEONG, M.L.; BETHWAIT, P.B.; PRASAD, J.; ISBISTER, W.H. Lymphoid follicular hyperplasia – a distinctive feature of diversion colitis. **Histopathology**, v. 19, n. 1, p. 55-61, 1991.

ZANG, S.; LIU, T.; SHI, J.; QIAO, L. Curcumin: a promising agent targeting cancer stem cells. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 14, n. 6, p. 787-792, 2014.

ZENG, Z.; ZHAN, L.; LIAO, H.; CHEN, L.; LV, X. Curcumin improves TNBS-induced colitis in rats by inhibiting IL-27 expression via the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Planta Med**, v. 79, n. 2, p.102-109, 2013.

ZHAO, X.; CHEN, Q.; LIU, W.; LI, Y.; TANG, H.; LIU, X.; YANG, X. Codelivery of doxorubicin and curcumin with lipid nanoparticles results in improved efficacy of chemotherapy in liver cancer. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 257-270, 2014.

ZHANG, M.; DENG, C.; ZHENG, J.; XIA, J.; SHENG, D. Curcumin inhibits trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 8, p. 1233-1242, 2006a.

ZHANG, M.; DENG, C.S.; ZHENG J.J.; XIA, J. Curcumin regulated shift from Th1 to Th2 in trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. **Acta Pharmacol Sin**, v. 27, n. 8, p. 1071-1077, 2006b.

## ANEXOS

### Anexo I: Carta de aprovação do comitê de ética.

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 22 de Novembro 2007.

#### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Projeto de Pesquisa:** "Avaliação da correlação entre as alterações histológicas, histoquímicas, expressão tecidual da proteína p53 e o dano oxidativo do DNA nas células da mucosa cólica de ratos submetidos à colite de exclusão".

**Autor(es):** Dr. Carlos Augusto Real Martinez; Dr. Marcelo Lima Ribeiro; Ms. Denise G Prioli; Ms. Carlos Alves Fontes de Souza; Ms. José Aires Pereira.

**Instituição:** Universidade São Francisco

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, em reunião ordinária realizada no dia 22 de Novembro de 2007, analisou o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer:** Aprovado

Atenciosamente,

  
 José Pedrazzoli Júnior  
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
 Universidade São Francisco