

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

CALED JAOUDAT KADRI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓPICOS DO EXTRATO
OLEOSO DE *CURCUMA LONGA L.* (CURCUMINA) NO
CONTEÚDO TECIDUAL DAS PROTEÍNAS CLAUDINA-3,
OCLUDINA, E-CADERINA E β -CATENINA E
MIELOPEROXIDASE NAS GLÂNDULAS DA MUCOSA
CÓLICA DESPROVIDA DE TRÂNSITO INTESTINAL**

Bragança Paulista
2015

CALED JAOU DAT KADRI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓPICOS DO EXTRATO
OLEOSO DE *CURCUMA LONGA L.* (CURCUMINA) NO
CONTEÚDO TECIDUAL DAS PROTEÍNAS CLAUDINA-3,
OCLUDINA, E-CADERINA E β -CATENINA E
MIELOPEROXIDASE NAS GLÂNDULAS DA MUCOSA
CÓLICA DESPROVIDA DE TRÂNSITO INTESTINAL**

Tese apresentada ao programa de Pós
Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da
Saúde da Universidade São Francisco,
como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor em Ciências da Saúde.
Area de Concentração: Biologia Celular e
Molecular

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Real
Martinez

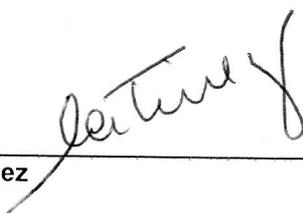
Bragança Paulista
2015

WI 522 Kadri, Caled Jaoudat.
K14a Avaliação dos efeitos tópicos do extrato oleoso de *Curcuma longa* L. (curcumina) no conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina e β -catenina e mieloperoxidase nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal / Caled Jaoudat Kadri. -- Bragança Paulista, 2015.
115 p.

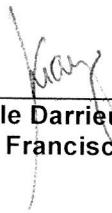
Tese (Doutorado) – Programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.
Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

1. Colite. 2. Colite de exclusão. 3. Curcuma. 4. Proteína claudina-3. 5. β -catenina. 6. Ocludina. 7. Peroxidase. 8. E-Caderina. I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.

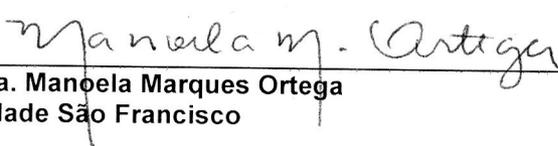
KADRI, J., Caled, "Avaliação dos efeitos tópicos do extrato oleoso de *Curcuma Longa L.* (curcumina) no conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, e-caderina, β -catenina e mieloperoxidase nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal". Tese defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 07 de dezembro de 2015 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



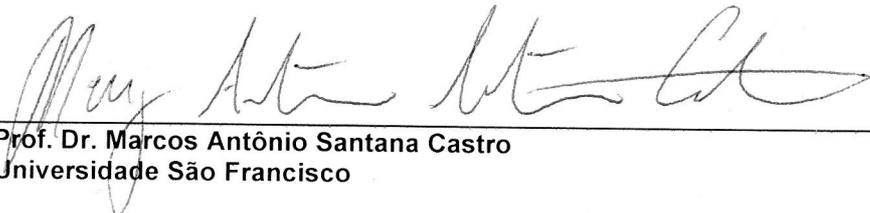
Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Manoela Marques Ortega
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Marcos Antônio Santana Castro
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Murillo de Oliveira Antunes
Universidade São Francisco

Dedico este trabalho inicialmente aos meus pais; pois os considero muito especiais; à minha esposa e filhos, o meu muitíssimo obrigado por compreenderem minhas ausências e sempre me confortarem com muito **AMOR**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**, por proporcionar meu crescimento profissional e pessoal.

À **FAPESP** por tornar este sonho possível e concreto.

Ao meu professor orientador **CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ**, que sempre esteve presente e disposto a discutir minhas idéias e dúvidas, colaborando assim com a concretização deste trabalho.

Aos funcionários do **BIOTÈRIO CENTRAL DA UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO** pelo primoroso cuidado com os animais de experimentação.

Ao professor **JOSÉ AIRES PEREIRA** pela análise histopatológica e técnicas realizadas durante este estudo.

Aos alunos **CELENE BENEDITI BRAGION, DANIELA TIEMI SATO E MURILO ROCHA RODRIGUES** pelo auxílio fundamental nas etapas experimentais do presente estudo.

As funcionárias **VILMA TESCKE DE FREITAS** e **TATINE OLIVEIRA** pelo empenho e dedicação a este programa de pós-graduação da Universidade São Francisco

“Deus concede a sabedoria a quem quer. E, àquele, a quem é concedida a sabedoria, com efeito, é-lhe concedido um bem abundante. E não meditam senão os dotados de discernimento.”

O Alcorão Sagrado

يُؤْتِي الْحِكْمَةَ مَنْ يَشَاءُ ۚ وَمَنْ يُؤْتَ الْحِكْمَةَ فَقَدْ
أُوتِيَ خَيْرًا كَثِيرًا ۚ وَمَا يَذَّكَّرُ إِلَّا أُولُو الْأَلْبَابِ

RESUMO

O epitélio da mucosa cólica representa a mais perfeita barreira morfofuncional do corpo humano. Uma única camada de células separa a luz do cólon rica em bactérias e antígenos do meio interno estéril. Estudos já mostraram em modelos experimentais de colite de exclusão que o aumento na produção de radicais livres de oxigênio pelas células da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal ocasiona ruptura das diferentes linhas de defesa da barreira mucosa possibilitando o desenvolvimento da colite. O estresse oxidativo danifica as proteínas existentes nas junções intercelulares. É possível que o emprego de substâncias antioxidantes possa proteger a barreira epitelial do estresse oxidativo decorrente da exclusão intestinal. A curcumina, substância extraída do rizoma da *Curcuma longa*, pela sua notável ação antioxidante, vem sendo utilizada para o tratamento de diferentes enfermidades decorrentes do processo inflamatório tecidual. Todavia, os efeitos da curcumina ainda não foram estudados em modelos experimentais ou pacientes com colite de exclusão. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do extrato oleoso de *Curcuma longa* (curcumina) no conteúdo tecidual das proteínas das junções de oclusão e de adesão intercelular. **Métodos:** Trinta e seis ratos Wistar foram submetidos à derivação do trânsito por colostomia proximal e fístula mucosa distal. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais os quais receberam enemas diários com solução fisiológica 0,9%, extrato oleoso de *Curcuma longa* na concentração de 50 mg/kg/dia ou 200 mg/kg/dia. Cada grupo experimental foi dividido em 2 subgrupos, segundo a eutanásia ser realizada após 2 ou 4 semanas de intervenção. O diagnóstico de colite foi estabelecido por estudo histológico com a técnica da hematoxilina-eosina e o infiltrado neutrofílico pela expressão tecidual de mieloperoxidase. As proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina, β -catenina e mieloperoxidase na mucosa sem trânsito intestinal foram identificadas por imunistoquímica utilizando-se anticorpos primários monoclonais específicos para cada proteína com a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. O conteúdo tecidual das proteínas nas glândulas cólicas foi mensurado por análise de imagem assistida por computador. O valor final encontrado para o conteúdo tecidual das diferentes proteínas foi expresso pelos valores médios encontrados na leitura de três campos histológicos distintos. Para análise dos resultados utilizou-se o teste t de Student e o teste ANOVA, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** A intervenção com extrato oleoso de *Curcuma longa* reduz o processo inflamatório e diminui a infiltração neutrofílica da mucosa cólica desprovida de trânsito fecal, principalmente quando se utiliza concentrações mais elevadas da substância por maior período de intervenção. A aplicação preventiva de enemas com extrato oleoso de curcumina preserva o conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina e β -catenina e reduz o conteúdo de mieloperoxidase nas glândulas da mucosa desprovida de trânsito intestinal, principalmente quando se intervém com concentrações maiores da substância e por tempo de intervenção mais prolongado. **Conclusão:** A aplicação de enemas com extrato oleoso de *Curcuma longa* reduz o processo inflamatório na mucosa cólica desprovida de trânsito fecal e aumenta o conteúdo das principais proteínas componentes dos sistemas de adesão intercelular tornando-se uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da colite de exclusão.

ABSTRACT

The epithelium of the colonic mucosa is the most perfect human body morpho-functional barrier. A single layer of cells separates the colonic lumen, which is rich in bacterias and antigens from sterile internal submucosa. Studies have shown in experimental models of diversion colitis the increased production of oxygen free radicals by the colonic mucosa cells devoided of fecal stream causes rupture of different protection lines of colonic mucosa barrier enabling the development of colitis. Oxidative stress can damage the proteins existing in intercellular junctions. It is possible that the use of antioxidants can protect the epithelial barrier of oxidative stress resulting from diversion of the fecal stream. Curcumin, a substance extracted from the rhizome of *Curcuma longa*, for its antioxidant properties, has been used to treat different diseases resulting from tissue inflammation. However, the effects of curcumin have not been studied in experimental models or patients with diversion colitis. **Objective:** To evaluate the effects of the oil extract of *Curcuma longa* (curcumin) in tissue content of proteins of tight and adherents junctions. **Methods:** Thirty-six Wistar rats were underwent to diversion of the fecal stream by proximal colostomy and distal mucous fistula. The animals were divided into 3 experimental groups according have received daily enemas with saline, oil extract of *Curcuma longa* at a concentration of 50 mg / kg / day or 200 mg / kg / day. Each experimental group was divided into two subgroups, according the euthanasia was performed after 2 or 4 later. The diagnosis of colitis was established by histological study with the technique of hematoxylin-eosin and the neutrophil infiltrate by tissue expression of myeloperoxidase. The claudin-3 protein, occludin, E-cadherin, β -catenin and myeloperoxidase in glands of the intestinal mucosal were identified by immunohistochemistry using specific monoclonal primary antibodies for each protein with the technique of streptavidin-biotin-peroxidase. Tissue content of proteins in the colonic glands was measured by computer-assisted image analysis. The final value of the tissue content of different protein was expressed by the mean e values found in the reading of three distinct histological fields. To analyze the results we used the Mann-Whitney, Student t test and ANOVA test, adopting a significance level of 5% ($p < 0.05$). **Results:** The intervention with oil extract of *Curcuma longa* reduces inflammation and the neutrophil infiltrate of the colonic mucosa devoid from the fecal stream, especially when using higher concentrations of the substance by greater intervention period. The preventive application enemas oil extract of curcumin preserves the tissue content of claudin-3 protein, occludin, E-cadherin, β -catenin and reduces the content of myeloperoxidase in mucous glands devoid from the fecal stream, particularly when were used greater concentrations of substance and prolonged time of intervention. **Conclusion:** The use of enemas with oil extract of *Curcuma longa* reduces inflammation in the colon mucosa devoid of the fecal stream and increases the content of the main protein components of intercellular adhesion systems making it a promising therapeutic strategy for the treatment of diversion colitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração autoexplicativa das camadas da parede cólica.....	22
Figura 2 - Ilustração autoexplicativa das junções intercelulares.....	23
Figura 3 - Ilustração autoexplicativa das junções de oclusão intercelular	24
Figura 4 – Ação do radical OH ⁻ , potente RLO, sobre a proteína conexina nas junções comunicantes provocando alterações da permeabilidade intercelular.....	25
Figura 5 - Conexão entre duas moléculas da proteína E-caderina no espaço intercelular (domínio intercelular) (Modificada de <i>PECINA-SLAUS, 2010</i>)	27
Figura 6 - Proteínas P-120, β-catenina, α-catenina conectadas a proteína actina no citoplasma (domínio intracelular) e à proteína E-caderina no espaço intercelular. ...	27
Figura 7 - A: Junção de adesão celular íntegra. Conteúdo intracelular de β-catenina normal. B; Quebra da junção de adesão com aumento do conteúdo citoplasmático de β-catenina e migração para o interior do núcleo estimulando a transcrição de genes de resposta da via Wnt.	30
Figura 8 - Segmento da parede cólica obtido de doente com CE. Existe perda epitelial na superfície mucosa (seta vermelha), infiltrado inflamatório (seta amarela), congestão vascular (seta branca) e hiperplasia linfóide nodular (seta preta). (H.E. 100x).....	33
Figura 9 - <i>Curcuma longa</i> : caule folhas, rizoma e seu extrato	40
Figura 10 - Plantação de <i>Curcuma longa</i> no Brasil	40
Figura 11 - Fórmulas químicas estruturais dos principais pigmentos encontrados no extrato de <i>Curcuma longa</i>	40
Figura 12 - Potenciais efeitos terapêuticos da curcumina (Modificado de AGGARWAL; SUNG, 2008)	43
Figura 13 – Limpeza mecânica anterógrada do cólon distal a ser excluído de trânsito fecal (seta).....	50
Figura 14 - Subdivisão dos grupos experimentais.....	51
Figura 15 - Expressão da proteína E-caderina em segmento cólico deprovido de trânsito de animal submetido à intervenção com SF 0,9% por 4 semanas (200x)....	55

Figura 16 - Imagem binária utilizada para quantificação da expressão tecidual da proteína E-caderina (coloração branca) por análise de imagem assistida por computador no mesmo campo histológico acima descrito (200 x).....55

Figura 17 - A: Mucosa cólica em segmento desprovido de trânsito fecal submetido à intervenção com S.F. 0,9% por quatro semanas. Notar a formação de úlcera epitelial (seta preta), infiltrado inflamatório entre as glândulas cólicas (seta branca) e dilatação do citoplasma das células calciformes (HE-400x). **B:** Mucosa cólica em segmento desprovido de trânsito fecal submetido à intervenção com curcumina na concentração de 200 mg/kg/dia por quatro semanas. O epitélio é regular, sem formação de úlceras na mucosa e com menor infiltrado inflamatório entre as glândulas (HE-200x).....58

Figura 18 – Valores do escore inflamatórios em média com respectivo desvio padrão, dos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%, curcumina 50mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por duas e quatro semanas. ** = siginificante, $p < 0,01$ (Curcumina 200mg/kg/dia × SF 0,9%). •• = significante, $p < 0,01$ (Curcumina 200 mg/kg/dia × Curcumina 50 mg/kg/dia). Teste t de Mann-Withney.....60

Figura 19 – A: Expressão da proteína claudina-3 em animas submetido à intervenção com SF 0,9% por 2 semanas. Existe menor expressão tecidual da proteína claudina-3 na superfície apical do epitélio cólico (IH-claudina-3 400x). **B:** Expressão intensa da proteína claudina-3 na superfície epitelial de animal submetido a intervenção com extrato oleoso de curcumina na dosagem de 200 mg/kg/dia por 4 semanas (IH-claudina-3 400x).....60

Figura 20 – Conteúdo da proteína claudina-3 nas glândulas da mucosa exclusa de trânsito intestinal submetida a intervenção com SF 0,9%, curcumina (50 mg/Kg/dia) e curcumina (200mg/kg/dia) por duas e quatro semanas. ** = significante com $p < 0,01$ (Curcumina 50 mg/kg/dia > SF0,9% e Curcumina 200 mg/kg/dia > SF 0,9%); †† = significante com $p < 0,01$ (Curcumina 200 mg/kg/dia > Curcumina 50 mg/kg/dia). Teste de t de Student.....61

Figura 21 – A: Pequena expressão da proteína ocludina na superfície epitelial de animal submetido à intervenção com SF por 2 semanas (IH- ocludina 400x). **B:** Maior expressão da proteína ocludina na superfície epitelial de animal submetido à intervenção com extrato oleoso de curcumina (200 mg/kg/dia) por 4 semanas (IH- ocludina 400x).....62

Figura 22- Conteúdo tecidual de ocludina nos segmentos sem trânsito intestinal após 2 e 4 semanas de intervenção com soro fisiológico 0,9% (controle), ou extrato oleoso de *Curcuma longa*. ** = significante: *Curcuma longa* 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia > SF, após duas e quatro semanas de intervenção ($p < 0,01$). † = significante: 200mg/kg/dia > 50mg/kg/dia ($p < 0,05$). Teste t de Student.....63

Figura 23 – A: Pequena expressão tecidual da proteína E-caderina na região apical das glândulas da mucosa cólica submetidas à intervenção com SF 0,9% por quatro semanas (IH-E-caderina 200×). **B:** Intensa expressão tecidual da proteína E-caderina nas glândulas da mucosa cólica de animal submetido à intervenção com extrato oleoso de curcumina na concentração de 200 mg/kg/dia por quatro semanas (IH-E-caderina 400×).....64

Figura 24– Conteúdo da proteína E-caderina nas glândulas da mucosa exclusiva de trânsito intestinal submetida a intervenção com SF 0,9%, curcumina (50 mg/Kg/dia) e curcumina (200mg/kg/dia) por duas e quatro semanas. ** = significante com $p < 0,01$ (Curcumina 50 mg/kg/dia > SF0,9% e Curcumina 200 mg/kg/dia > SF 0,9%) ; • = significante com $p < 0,05$ (Curcumina 200 mg/kg/dia > Curcumina 50 mg/kg/dia após 2 ou 4 semanas). Teste t de Student.....65

Figura 25- A: Pouca expressão tecidual da proteína β -catenina na superfície epitelial das glândulas da mucosa cólica de animal submetido à intervenção com SF 0,9% por quatro semanas (IH- β -catenina 200×). **B:** Expressão tecidual intensa da proteína β -catenina na região apical das glândulas da mucosa cólica submetidas à intervenção com extrato oleoso de curcumina na concentração de 200 mg/kg/dia por quatro semanas (IH- β -catenina 400×).....66

Figura 26 – Conteúdo da proteína β -catenina nas glândulas da mucosa exclusiva de trânsito intestinal submetida à intervenção com SF 0,9%, curcumina (50 mg/Kg/dia) e curcumina (200mg/kg/dia) por duas e quatro semanas. ** = significante com $p < 0,01$ (Curcumina 50 mg/kg/dia > SF0,9% e Curcumina 200 mg/kg/dia > SF 0,9%); = significante com $p < 0,05$ (Curcumina 200 mg/kg/dia > Curcumina 50 mg/kg/dia após quatro semanas). Teste t de Student.67

Figura 27- A: Expressão tecidual da enzima MPO em neutrófilos existentes no estroma e lamina basal das glândulas da mucosa cólica submetidas a intervenção com SF 0,9% por quatro semanas (setas pretas) (IH-E-caderina 200×). **B:** Expressão tecidual da enzima MPO nos neutrófilos no estroma das glândulas da mucosa cólica submetidas a intervenção com extrato oleoso de curcumina na concentração de 200 mg/kg/dia por quatro semanas (setas pretas) (IH-E-caderina 400×).....68

Figura 28 – Conteúdo da enzima MPO no estroma das glândulas da mucosa exclusiva de trânsito intestinal submetida a intervenção com SF 0,9%, curcumina (50 mg/Kg/dia) e curcumina (200mg/kg/dia) por duas e quatro semanas. ** = significante com $p < 0,01$ (Curcumina 50 mg/kg/dia < SF0,9% e Curcumina 200 mg/kg/dia < SF 0,9%); † = significante com $p < 0,05$ (Curcumina 200 mg/kg/dia < Curcumina 50 mg/kg/dia após quatro semanas). Teste t de Student.70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Principais substâncias encontradas no extrato de <i>Curcuma longa</i> (quantidade por 100g do extrato)	41
Tabela 1 – Variação no conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, e-caderina, β -catenina e MPO na mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal submetida à curcumina (50mg/kg/dia) e 200mg/kg/dia após duas e quatro semanas.	70
Quadro 2- Principais alvos celulares para ação da curcumina	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	- Ácidos Graxos de Cadeia Curta
Ca ⁺⁺	- Cálcio
CCR	- Câncer colorretal
CAM	- Cell Adhesion Molecules (do inglês)
CE	- Colite de exclusão
COX-1	- Cicloxigenase 1
COX-2	- Cicloxigenase -2
DII	- Doenças Inflamatórias Intestinais
DNBS	- Ácido dinitrobenzenosulfônico
DSS	- Sulfato de dextrana
Gbytes	- Gigabites
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
IL	- Interleucina
IH	- Imunoistoquímica
INF- γ	- Interferon gama
iNOS	- Forma induzida do óxido nítrico síntese
g/mol	- Grama por mol
JNK	- Via de sinalização da janus quinase
kDa	- Quilodáltons
Kg	- Quilograma

LOX	- Lipoxigenase
Mg	- Miligrama
MPO	- Mieloperoxidase
NAC	- N-acetilcisteína
MAPK	- Mitogen Activated Protein Kinases (do inglês)
NF-κB	- Fator de transcrição nuclear B
OH [·]	- Radical hidroxila
PCR	- Proteína C reativa
PGE-2	- Prostaglandina E-2
RAM	- Random Access Memory (do inglês)
RGB	- Red, Green, Blue (do inglês)
RLO	- Radicais Livres de Oxigênio
STAT3	- Signal transducer and activator of transcription 3 pathway (do inglês)
Th1	- células com receptores Th1
Th2	- células com receptores Th2
TNBS	- Ácido trinitrobenzenosulfônico
TNF-α	- Fator de Necrose Tumoral α
Wnt	- Via de sinalização celular Wnt
5-ASA	- Ácido 5-aminosalicílico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 O epitélio cólico	22
2.2 Mecanismos de junção intercelular	22
2.3 Colite de exclusão	30
2.4 Colite e estresse oxidativo.....	35
2.5 Colite de exclusão e estresse oxidativo	37
2.6 Curcuma longa (curcumina)	40
2.7 Mieloperoxidase	46
3 OBJETIVOS	48
4 MATERIAL E MÉTODO	49
4.1 Aspectos éticos	48
4.2 Animais de experimentação	48
4.3 Técnica Cirúrgica	48
4.4 Grupos experimentais	50
4.5 Coleta de Amostras	50
4.6 Análise histológica.....	51
4.6.1 Hematoxilina-eosina	51
4.6.2 Técnica imunoistoquímica	51
4.7 Graduação inflamatória	53
4.8 Quantificação do conteúdo das proteínas	54
4.9 Análises Estatísticas	56
5 RESULTADOS	58
5.1 Escore inflamatório.....	58
5.2 Claudina-3	60

5.3 Ocludina	62
5.4 E-caderina	64
5.5 β -catenina	66
5.6 MPO	68
5.7 Variação no conteúdo das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina, β -catenina e MPO em relação ao tempo de intervenção (duas ou quatro semanas)	70
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÕES	86
8 REFERÊNCIAS	86
ANEXO I - Carta de Aprovação do Comitê de Ética	111
ANEXO II - Planilhas com os resultados finais para as variáveis analisadas	112
ANEXO III - Artigo publicado.....	113
ANEXO IV - Tabalhos apresentados em Congressos Médicos	114

1 INTRODUÇÃO

Colite de exclusão (CE) é uma doença inflamatória que acomete segmentos do intestino grosso desprovidos de trânsito intestinal (GLOTZER et al., 1981). Estudos sugerem que a etiopatogenia da enfermidade se encontra relacionada à deficiência do suprimento de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principal substrato energético das células constituintes do epitélio cólico (BOSSHARDT; ABEL, 1984; AGARWAL; SCHIMMEL, 1989; HARIG et al., 1989; FERGUSON; SIEGEL, 1991; GERAGHTY; TALBOT, 1991; HAQUE; WEST, 1992; MORTENSEN; CLAUSEN, 1996; COOK; SELLIN, 1998). E essa provável origem etiopatogênica é reforçada por estudos clínicos e experimentais cujos resultados indicaram que o fornecimento de soluções nutricionais ricas em AGCC, reestabeleceu o trânsito fecal ou o transplante autólogo de fezes para o cólon excluído de trânsito fecal regridem as alterações inflamatórias características da CE (HARIG et al., 1989; GUILLEMOT et al., 1991; BUTZNER et al., 1996; SCHEPPACH et al., 1997; EGGENBERGER; FARID, 2001; OLIVEIRA NETO; AGUILAR-NASCIMENTO, 2004; NASRRI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; PACHECO et al., 2012; KABIR et al., 2014; GUNDLING et al., 2015). Também se demonstrou que a inibição experimental da metabolização dos AGCC nas células do epitélio cólico, pelo bloqueio da β -oxidação dos AGCC leva ao desenvolvimento da CE, referendando a importância dessas substâncias para a obtenção de energia pelas células epiteliais (ROEDIGER; NANCE, 1986).

Os mecanismos moleculares pelos quais a deficiência no suprimento de AGCC leva ao surgimento da CE ainda são controversos. Estudos histológicos avaliando o epitélio mucoso de doentes portadores de CE mostraram que existe ruptura da barreira mucosa cólica com a formação de úlceras aftóides epiteliais e infiltração inflamatória nas camadas mucosa e submucosa da parede intestinal (LUSK et al., 1984; MURRAY et al., 1987; KOMOROWSKI, 1990; GERAGHTY; TALBOT, 1991; HAQUE; EISEN; WEST, 1993; GERAGHTY; CHARLES, 1994; GRANT et al., 1997; FRISBIE et al., 2000; SOUZA et al., 2008; SOUSA, 2009).

O epitélio do cólon é uma das mais perfeitas barreiras funcionais do corpo humano separando o interior do lúmen intestinal, que concentra grande concentração bacteriana, do meio interno estéril (PEREIRA et al., 2013; CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015). Essa barreira mucosa é formada por uma série de estruturas celulares que conferem proteção mecânica e por células de defesa do sistema imune que

constituem uma barreira funcional imunológica. Esses dois sistemas atuando em conjunto são responsáveis pela separação entre os meios interno e externo. As estruturas celulares que formam a barreira de proteção mecânica são constituídas por diferentes linhas de defesa, principalmente representadas pela camada de muco que recobre o epitélio, as membranas citoplasmáticas das células epiteliais, o complexo sistema de junções intercelulares e a membrana basal (MARTINEZ, 2010; MARTINEZ et al., 2010b). A proteção funcional, por sua vez, é conferida por células do sistema imune representadas por neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e macrófagos, bem com por citocinas e anticorpos abundantes na parede do intestino grosso, considerado o maior sistema linfóide do corpo humano. Já se demonstrou que os mecanismos de proteção mecânica encontram-se danificados na CE (SOUZA et al., 2008; SOUSA, 2009; NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010a; MARTINEZ et al., 2010b; KADRI, 2010; FABRIS, 2011; MARTINEZ et al., 2012; KADRI et al., 2013; CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015).

Em uma sequência de estudos realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM) da Universidade São Francisco demonstrou-se que as células da mucosa cólica desprovidas do suprimento normal de AGCC, sofrem alteração nas reações bioquímicas celulares necessárias para produção de energia, tendo como consequência a produção de maior quantidade de radicais livres de oxigênio (RLO) (MARTINEZ et al., 2010b). Os RLO são substâncias tóxicas para as células e tecidos que para neutralizá-los, possuem sistemas antioxidantes específicos (PRAVDA, 2005). Todavia, quando a produção de RLO excede a capacidade dos sistemas antioxidantes em neutralizá-los existe o desenvolvimento de uma condição patológica conhecida como estresse oxidativo. No estresse oxidativo, o excesso de RLO produzido reage com constituintes células epiteliais, danificando-os e ocasionando quebra dos diferentes mecanismos estruturais de proteção mecânica da mucosa cólica (PRAVDA, 2005; MARTINEZ et al, 2010b). Esses estudos mostraram que os RLO são capazes de reduzir e modificar a produção de mucinas que recobrem a mucosa (NONOSE et al, 2009; MARTINEZ et al, 2010b), danificar as membranas citoplasmáticas (MARQUES et al., 2010), romper as junções aderentes intercelulares, principalmente formadas pelas proteínas E-caderina (KADRI, 2010; KADRI et al., 2013) e β -catenina (FABRIS, 2011; MARTINEZ et al., 2012) e junções de oclusão constituídas pelas proteínas claudina e ocludina (CARVALHO, 2013; FERREIRA, 2013; MARTINEZ et al., 2015). Todas essas alterações mostraram-se relacionadas ao desenvolvimento da CE e aos maiores níveis teciduais de RLO.

As evidências de que os RLO são as moléculas responsáveis pelos danos à barreira de proteção mecânica descritos na CE ficaram reforçadas por estudos mostrando que a aplicação tópica de substâncias, naturais ou sintéticas, com atividade antioxidante na mucosa exclusiva de trânsito intestinal, além de diminuir a produção de RLO, relacionava-se à melhora das alterações inflamatórias da mucosa cólica (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al., 2011; CUNHA et al., 2011; MARTINEZ et al., 2013; ALVARENGA et al., 2014; CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015). Corroborando com esses achados, outros estudos mostraram que a aplicação de enemas ricos em AGCC, restabelecendo o fornecimento do substrato energético habitual, reduzia a produção de RLO pelas células do epitélio cólico e melhorava as alterações inflamatórias características da CE (LAMEIRO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; PACHECO et al., 2012). Recentemente, esses achados foram tema de um editorial publicado em periódico internacional especializado em doenças digestivas, referendando a importância da manutenção do adequado suprimento energético a mucosa cólica para evitar o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais (DII) (HARTY, 2013).

Uma série de substâncias naturais vem sendo testadas para o tratamento das diferentes formas de colite. De um modo geral, essas substâncias possuem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes que atuam contra a inflamação epitelial (CUNHA et al., 2011; MARTINEZ et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015). Dentre as principais substâncias naturais utilizadas para o tratamento das colites, a curcumina, princípio ativo existente no rizoma da *Curcuma longa*, vem se mostrando promissora (BRUMATTI et al., 2014). Uma série de estudos experimentais confirmaram os benefícios da administração de curcumina em modelos experimentais de colite induzida pelos ácidosacético, dinitrobenzenosulfônico (DNBS), trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e sulfato de dextran sódico (DSS) (SUGIMOTO et al., 2002; SALH et al., 2003; UKIL et al., 2003; JIAN et al., 2005; JIANG et al., 2006; ZHANG et al., 2006a; CAMACHO-BARQUERO et al., 2007; DEGUCHI et al., 2007; BILLEREY-LARMONIER et al., 2008; ARAFA et al., 2009; LUBBAD; ORIOWO; KHAN, 2009a; TOPCU-TARLADACALISIR et al., 2013). Estudos clínicos, também mostraram os efeitos benéficos da curcumina em portadores de DII, em particular da colite ulcerativa (HANAI et al., 2006; LAHIFF; MOSS, 2011; LARMONIER et al., 2011; TAYLOR; LEONARD, 2011; ALI; SHAKIR; MORTON, 2012; BALIGA et al., 2012; SAREEN; JAIN; PANDIT, 2013; SINGLA et al., 2014; VECCHI BRUMATTI et al., 2014). Vários são os mecanismos propostos para a ação da curcumina na colite experimental, mas os efeitos antioxidantes da substância merecem lugar de destaque (BALIGA et al., 2012; BORRA et al., 2014; CARL et al., 2014).

Apesar de vários autores terem avaliado a eficácia terapêutica da curcumina em modelos de colite quimicamente induzida, no melhor do nosso conhecimento, os efeitos da substância ainda não foram estudados em modelos experimentais de CE. Não se conhece os efeitos da curcumina nas alterações inflamatórias da mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal. Da mesma forma, a ação da curcumina na manutenção da integridade dos diferentes sistemas de defesa que formam a barreira mecânica da mucosa cólica, também é desconhecida. Os efeitos da aplicação tópica de enemas contendo curcumina na preservação da integridade das proteínas que formam as junções de adesão e oclusão celular, principais componentes da barreira mucosa cólica, nunca foram avaliados.

Quando se demonstrou em modelos de CE que o estresse oxidativo é capaz de danificar proteínas constituintes das junções intercelulares, e que a curcumina possui notável ação anti-inflamatória e antioxidante, torna-se interessante avaliar a capacidade da substância em preservar a integridade das junções intercelulares. Caso a curcumina evite a degradação das principais proteínas componentes dessas junções, mantendo a integridade epitelial e evitando o surgimento da CE, seu baixo custo e fácil biodisponibilidade poderiam torná-la alternativa interessante para o tratamento da doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O epitélio cólico

A mucosa cólica é formada por um epitélio colunar simples. O que torna fascinante a arquitetura do epitélio é que ela constitui-se na mais perfeita barreira morfofuncional dos seres humanos. Formado por uma simples camada de células especializadas, justapostas e firmemente aderidas umas as outras, separa o conteúdo intraluminal, rico em bactérias e antígenos, do meio interno estéril (SOUSA et al., 2008; SOUSA, 2009).

O epitélio do intestino grosso apresenta algumas peculiaridades. Possui maior número de células caliciformes quando comparado ao do intestino delgado. O maior número de células caliciformes na mucosa cólica está relacionado à maior necessidade de produção de muco que, além de possuir uma ação lubrificante, forma, por sua ação bactericida, 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 pela lâmina própria estrutura composta por tecido conjuntivo frouxo infiltrado por muitas células de defesa e capilares. As glândulas cólicas, conhecidas como glândulas de Lieberkühn, em sua porção proximal são formadas por células especializadas, responsáveis pela função absorviva 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.

As células epiteliais situam-se sobre a camada muscular da mucosa, estrutura formada por pequena quantidade de fibras musculares. A camada muscular da mucosa serve de apoio para as células epiteliais possibilitando a manutenção das características estruturais da mucosa intestinal. A camada submucosa localiza-se logo abaixo da muscular da mucosa, sendo formada por uma espessa camada de tecido conjuntivo que dá suporte à camada mucosa e apresenta um rico plexo de vasos sanguíneos e linfáticos. Na camada submucosa está localizado o plexo nervoso submucoso (plexo de Meissner). Além de participar da peristalse intestinal a submucosa permite que a mucosa do cólon deslize sobre ela durante os movimentos intestinais. 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. A Fig.1 mostra esquematicamente as diferentes camadas que compõe a parede do intestino grosso

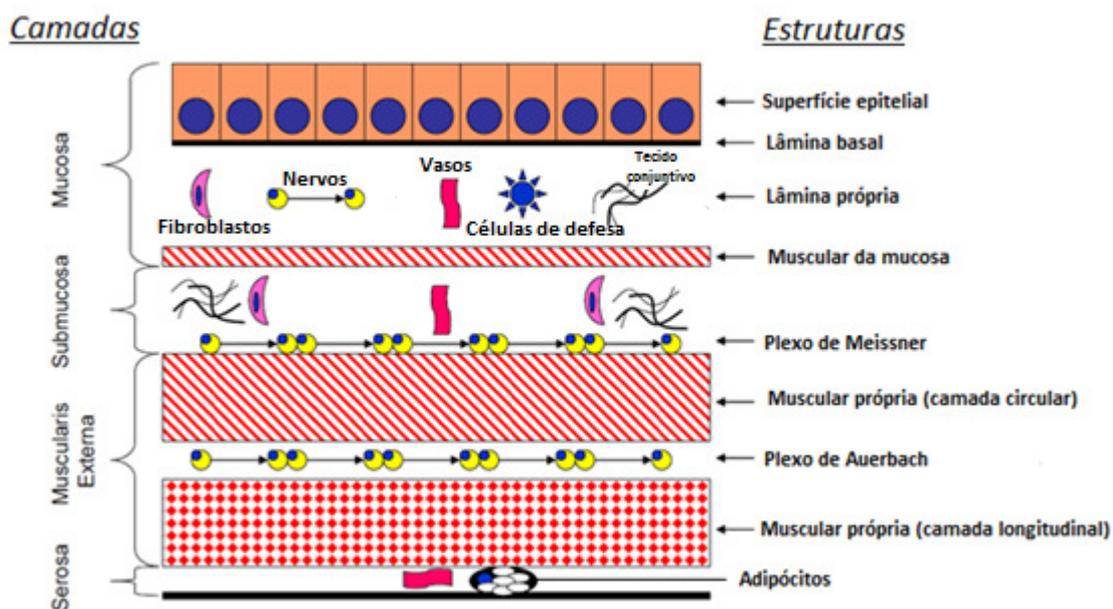


Figura 1 - Ilustração explicativa das camadas da parede cólica

Para que exista o desenvolvimento de qualquer forma de colite, seja ela decorrente de agressões biológicas, químicas ou físicas existe necessidade de que ocorra ruptura da mucosa intestinal, possibilitando a invasão bacteriana da submucosa com a consequente resposta inflamatória que caracteriza a doença.

2.2 Mecanismos de junção intercelular

A adesão celular é uma característica primária da arquitetura do epitélio do trato gastrointestinal. O tecido que reveste o tubo digestivo é formado por uma única camada de células epiteliais com funções absorptivas, intimamente aderidas entre si, e à lâmina basal (ALBERTS et al., 2004). As células epiteliais da mucosa cólica unem-se umas às outras por sistemas de adesões célula-célula, as quais suportam grande parte do estresse mecânico sobre a parede intestinal. Para manter esse mecanismo, filamentos protéicos de actina que formam o citoesqueleto celular, atravessam o citoplasma de cada célula epitelial unindo-se a

junções especializadas localizadas na membrana plasmática. Esse mecanismo é composto por numerosas moléculas de adesão celular (CAM). As CAM podem ser moléculas de adesão entre duas células vizinhas ou entre uma célula e a lâmina basal. Na mucosa do cólon essas moléculas são dependentes de cálcio (Ca^{++}) e podem ser destruídas quando se expõe o epitélio a substâncias quelantes do Ca^{++} , como o etileno-diamino-tetra-acético, ou ao estresse oxidativo (BABBS, 1992). As CAM da família das integrinas são responsáveis por manter as células epiteliais firmemente aderidas à lâmina basal, enquanto as junções celulares e os desmossomos respondem pelo sistema de adesão intercelular (ALBERTS et al., 2004; LODISH et al., 2004).

As junções intercelulares especializadas localizam-se em pontos onde existe contato entre duas células ou entre uma célula e a matriz extracelular. Para que as células funcionem de maneira integrada num arranjo compacto, são necessárias estruturas de adesão especializadas, formadas por CAM agrupadas (LODISH et al., 2004). Há três grupos funcionais de junções intercelulares: junções de oclusão, junções aderentes e junções comunicantes (Fig. 2).

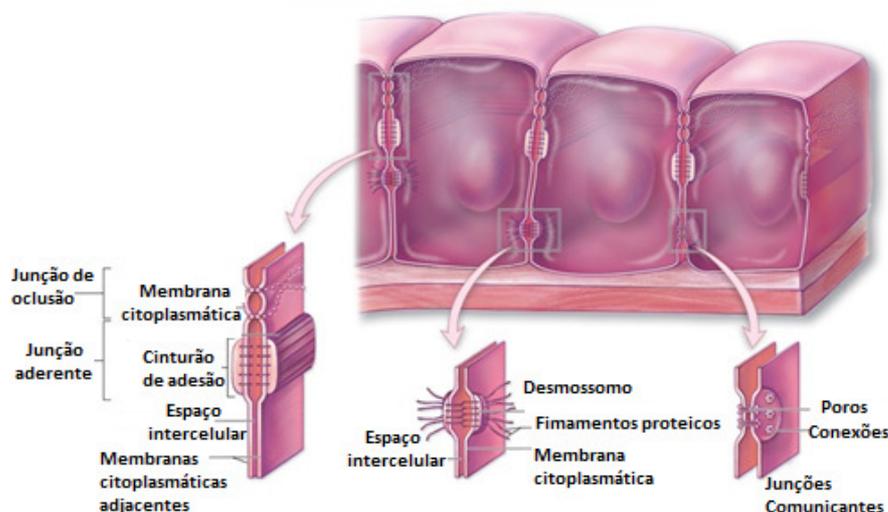


Figura 2 - Ilustração explicativa das junções intercelulares
(Reproduzido e traduzido de MC Graw-Hill Company, Inc.)

Disponível: http://www.apsubiology.org/anatomy/2010/2010_Exam_Reviews/Exam_1_Review/Ch03_The_Cell_and_Membrane_Structure.htm

As junções de oclusão têm como principal função selar, hermeticamente, as membranas entre duas células com intuito de evitar que íons e pequenas moléculas migrem de um lado para outro do espaço intercelular (LODISH et al., 2004). Ao mesmo tempo, permitem a passagem de nutrientes selecionados através do epitélio para o fluido

extracelular. As junções de oclusão são formadas, principalmente pelas proteínas claudinas (1-24), ocludinas e tricelulinas (Fig. 3).

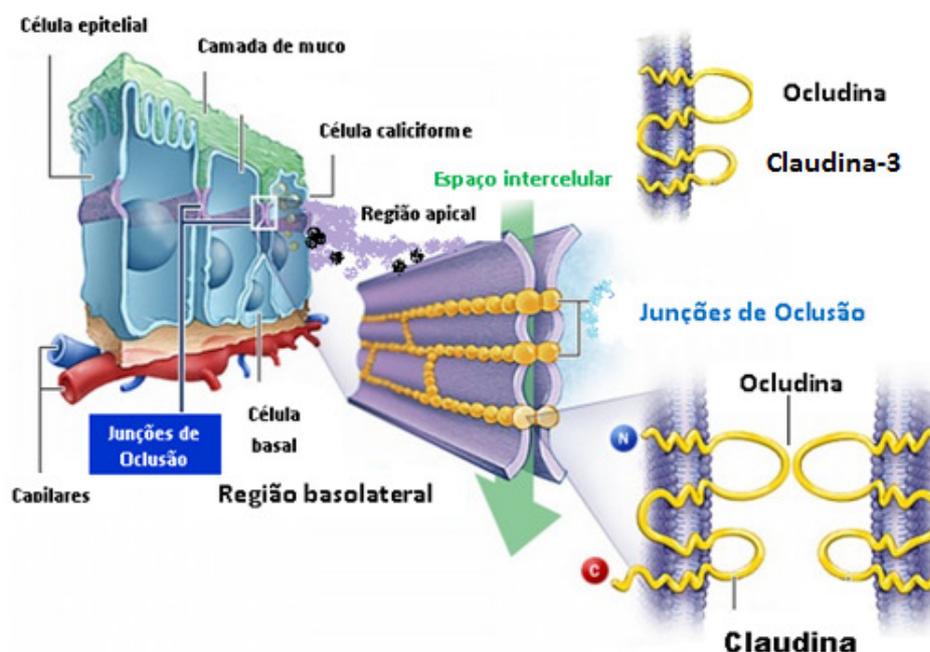


Figura 3- Ilustração explicativa das junções de oclusão intercelular
(Modificada de GUNZEL; FROMM, 2012)

Disponível: http://klinphys.charite.de/for721/f_summary_e.htm

A família das claudinas representa as principais proteínas constituintes das junções de oclusão, já se descrevendo 24 subtipos diferentes nos tecidos de mamíferos (ALBERTS et al., 2004). A maioria dos subtipos de claudinas tem importância capital nos mecanismos de adesão celular, enquanto outros se relacionam mais a regulação do trânsito de moléculas entre as células. Na mucosa do trato gastrointestinal as claudinas 1, 2, 3 e 23 são as mais importantes. No cólon, as claudinas 1 e 3 parecem ser as principais subclasses envolvidas nos mecanismos de adesão celular. Estudos demonstraram que o estresse oxidativo pode ocasionar a ruptura das pontes intercelulares de claudina por um mecanismo tirosinoquinase dependente (ALBERTS et al., 2004; LODISH et al., 2004; HAORAH et al., 2007). Estudos analisando a mucosa inflamada de doentes com DII ou em modelos experimentais de colite quimicamente induzida encontraram redução do conteúdo tecidual de claudina, o que além de facilitar a infiltração bacteriana permitia a migração neutrofílica pelo espaço intercelular (HANBY et al., 1996; GASSLER et al., 2001; KUCHARZIK et al., 2001).

A função da proteína ocludina ainda é pouco compreendida. Estudos mostraram nas junções intercelulares existe menor conteúdo tecidual de ocludina quando comparado ao de

claudina. Todavia, a formação do complexo claudina-occludina é fundamental para manter a integridade das junções de oclusão entre as células, assim como nos mecanismos de diferenciação celular (SAITOU et al., 2000). Já se demonstrou que o aumento na produção de citocinas e RLO na mucosa inflamada é reduz a expressão tecidual de occludina interferindo na capacidade de barreira celular. Essa redução é considerada um dos mecanismos encontrados nas DII (RAO et al., 1997; MANKERTZ et al., 2000; CHAPMAN; WATERS; MILLER, 2002; RAO et al., 2002).

As junções comunicantes, geralmente formadas por uma proteína denominada conexina, controlam a passagem de moléculas, íons, proteínas, impulsos elétricos ou químicos de uma célula à outra, estabelecendo uma complexa rede de comunicação entre um grupo de células epiteliais justapostas (Fig. 4). Através dos poros das junções comunicantes existe a passagem de íons e pequenas moléculas entre duas células vizinhas (LODISH, et al., 2004). É possível que essas junções possuam importância nos mecanismos de comunicação entre as células, bem como na regulação do metabolismo celular, sinalização e funcionamento das células epiteliais normais e em condições patológicas. Estudos mostraram que a proteína conexina, um dos mais importantes constituintes das junções comunicantes pode ser danificada por RLO sob condições de estresse oxidativo tecidual (LE et al., 2014).

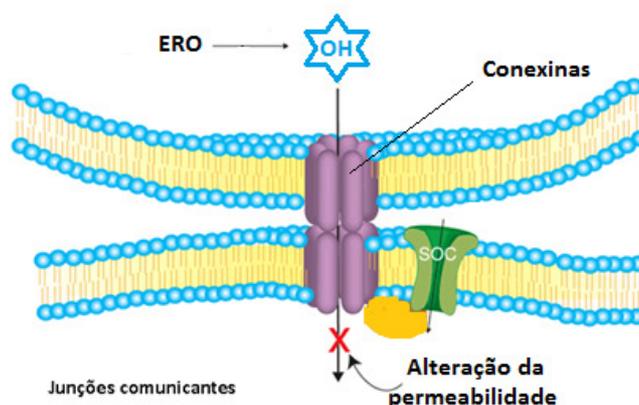


Figura 4 – Ação do radical OH^\cdot , potente RLO, sobre a proteína conexina nas junções comunicantes provocando alterações da permeabilidade intercelular.

(Modificada de *SPRAY, 2005*)

Disponível: <http://home.apu.edu/~jsimons/Bio101/cytology.htm>

As junções aderentes conectam o citoesqueleto interno de uma célula a outra, através de um complexo protéico formado pelas proteínas das famílias das caderinas, As cateninas, vinculinas e α -actina. As junções aderentes também se comunicam com

proteínas das vias de sinalização intracelulares capacitando-as a participarem dos mecanismos de sinalização existentes no interior das células (ALBERTS et al., 2004).

As caderinas são as principais proteínas constituintes das junções aderentes. Pertencem à família das CAM dependentes de Ca^{++} e desempenham papel fundamental na diferenciação tecidual, polarização e estratificação epitelial (DUBAND, THIERRY, 1990; ALBERTS et al., 2004; LODISH et al., 2004). Já se descreveram mais de 40 tipos de caderinas segundo o tecido onde são encontradas, porém as mais comuns são as caderinas E (epitelial), P (trofoblasto) e N (sistema nervoso). A E-caderina, é principal molécula de adesão celular encontrada no epitélio cólico (GUMBINER; MCREA, 1993). É uma proteína transmembrana com peso molecular de 120 (kDa), transcrita a partir do gene *cdh1*, localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q22.1) que, caracteristicamente, possui duplo domínio funcional, um extracelular e outro citoplasmático (ALBERTS et al., 2004; LODISH et al., 2004). O domínio citoplasmático da E-caderina se une a uma ou mais proteínas de ancoramento intracelular, enquanto o domínio extracelular interage com o domínio extracelular de outra molécula homóloga, proveniente da célula vizinha, por um mecanismo dependente do Ca^{++} (Fig. 5). Os íons Ca^{++} se posicionam entre cada molécula de E-caderina, mantendo as proteínas juntas com intuito de constituir um mecanismo de adesão mais rígido. A E-caderina atua como proteína de adesão transmembrana ligando, indiretamente, a actina do citoesqueleto de duas células vizinhas. No domínio citoplasmático a E-caderina interage com filamentos de actina de forma indireta, por meio de um grupo de proteínas de ancoramento denominadas cateninas, localizadas no citoplasma celular, paralelas ao folheto interno da membrana plasmática (Fig.6). No epitélio cólico normal o maior contingente da proteína E-caderina se expressa nas junções de aderência situadas logo abaixo das junções de oclusão na superfície apical das células. Estudos utilizando técnicas imunoistoquímicas demonstraram que a E-caderina é encontrada, principalmente, nas membranas das células epiteliais especializadas voltadas para a luz intestinal (NAGAFUCHI, TAKEICHI, 1988; DORUDI et al., 1993; JANKOWSKI; BEDFORD; KIM, 1997; JANKOWSKI et al., 1998).

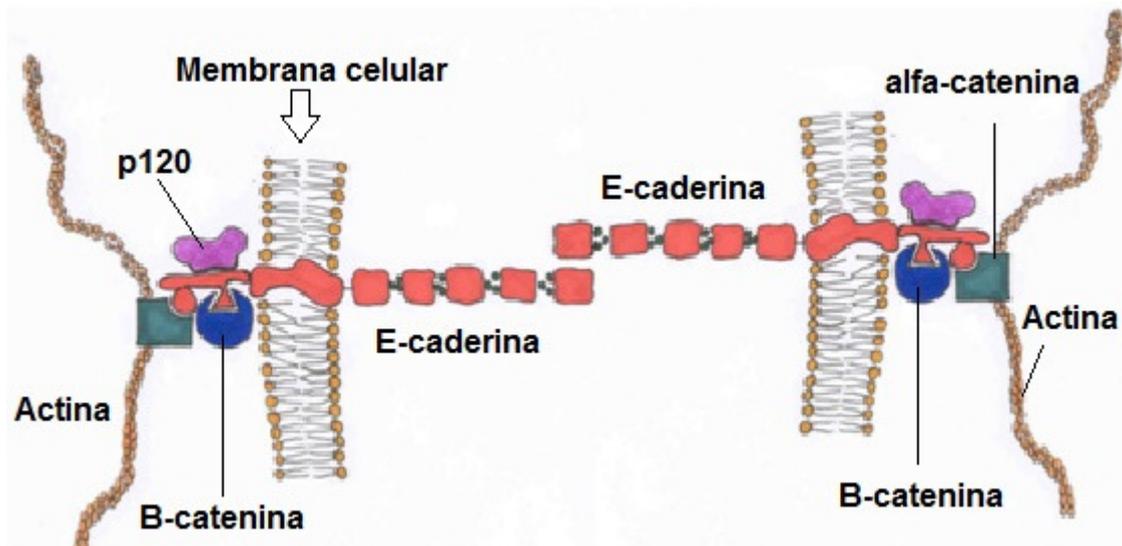


Figura 5 - Conexão entre duas moléculas da proteína E-caderina no espaço intercelular (domínio intercelular) (Modificada de *PECINA-SLAUS, 2010*)

Disponível: <http://www.cancer-ci.com/content/3/1/17/figure/F2>

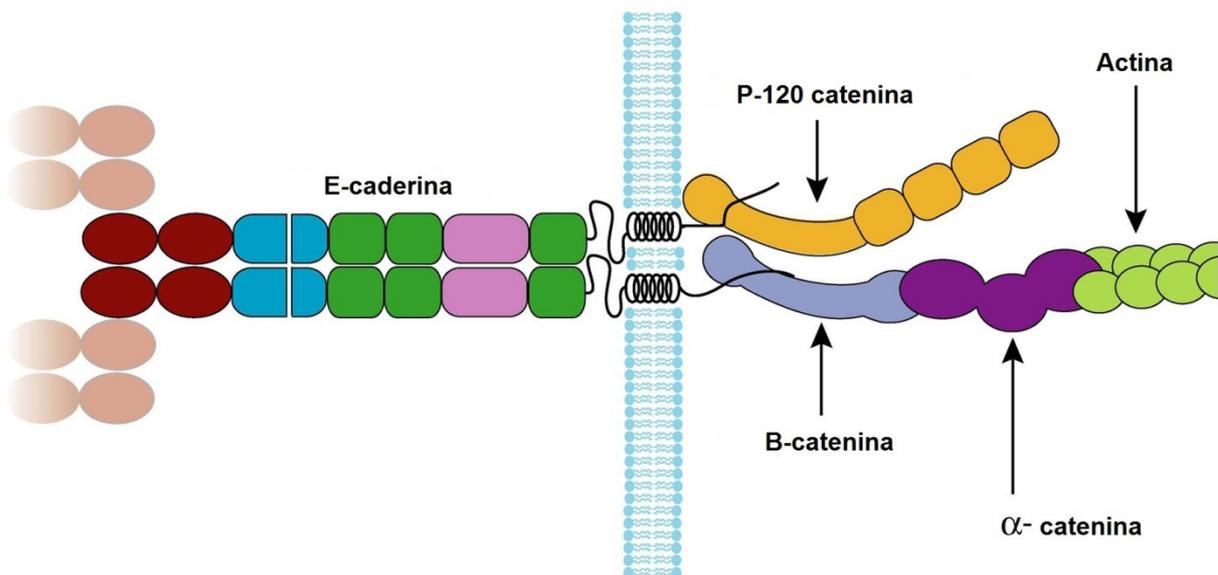


Figura 6 - Proteínas P-120, β -catenina, α -catenina conectadas à proteína actina no citoplasma (domínio intracelular) e à proteína E-caderina no espaço intercelular.

Disponível: http://www.wormbook.org/chapters/www_cadherinsuperfam/cadherinsuperfam.html

Para que ocorra o ancoramento entre a E-caderina e a actina do citoesqueleto celular, proteínas da família das cateninas (α -catenina, β -catenina, γ -catenina e p120) são imprescindíveis. As cateninas comunicam o domínio citoplasmático da E-caderina com a

actina celular por meio de interações entre as diferentes isoformas da proteína (NAGAFUCHI, TAKEICHI, 1988; OZAWA RINGWALD; KEMLER, 1990; DEMETTER et al., 2000). A β -catenina é uma proteína codificada pelo gene *ctn**nb**1* localizado no braço longo do cromossomo 8 (8q32) com peso molecular de 88 kDa. A isoforma β -catenina apresenta dupla função nas células, pois além de contribuir para mecanismos de adesão intercelular tem importância no sistema de sinalização celular mediado pela via de sinalização Wnt (ALBERTS et al., 2004). Quando existe dano às pontes de E-caderina no espaço intercelular, ocorre acúmulo de β -catenina livre no citoplasma celular. O maior contingente citoplasmático faz com que a β -catenina migre para o interior do núcleo celular induzindo a transcrição de genes-alvo relacionados à divisão celular (MORIN et al., 1997). Assim, a β -catenina além ser componente fundamental das junções aderentes participa da via de sinalização Wnt, responsável pela indução da divisão celular (Fig.7). Provavelmente, essa dupla função tenha importância relevante nos mecanismos de renovação das células do epitélio cólico, constantemente substituídas durante o processo inflamatório. Estudo e modelo de CE demonstrou que com a constante necessidade de renovação das células epiteliais danificadas por RLO existe maior expressão tecidual de β -catenina na zona proliferativa das criptas cólicas, justamente o local onde se localizam as células tronco multipotentes, principais responsáveis pelo processo de divisão celular (MARTINEZ et al., 2012).

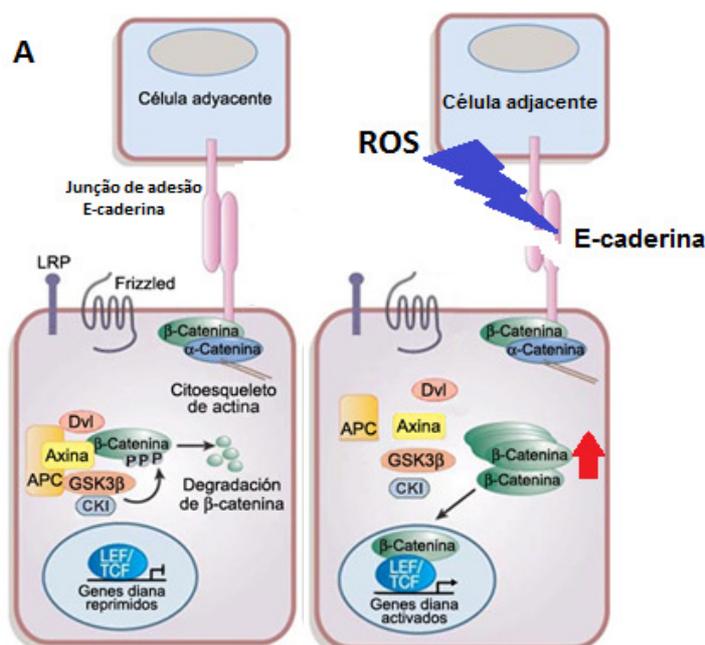


Figura 7 - A: Junção de adesão celular íntegra. Conteúdo intracelular de β -catenina normal. B; Quebra da junção de adesão com aumento do conteúdo citoplasmático de β -catenina e migração para o interior do núcleo estimulando a transcrição de genes de resposta da via Wnt.

(Modificado: *Tannishtha, Hans, 2005*)

Disponível: <http://www.nature.com/nature/journal/v434/n7035/full/nature03319.html>

Vários mecanismos são capazes de destruir as junções aderentes no epitélio cólico. Dentre esses mecanismos o estresse oxidativo possui lugar de destaque (PARRISH et al., 1999). Estudos mostraram que exposição da mucosa cólica a altas concentrações de RLO pode oxidar o íon Ca^{++} que mantém unidas as moléculas de E-caderina situadas entre duas células. Quando existe ruptura das moléculas de E-caderina, pela oxidação do Ca^{++} intercelular, ocorre aumento do conteúdo citoplasmático da β -catenina e, conseqüentemente, indução da divisão celular (SCHMEHL et al., 2000; MEYER et al., 2001). Os RLO também podem dissociar as junções entre as proteínas E-caderina e a β -catenina no citosol celular, por um mecanismo tirosino-quinase dependente, o que também pode ocasionar acúmulo citoplasmático da β -catenina induzindo a divisão celular (KATSUBE; TSUJI; ONODA, 2007). Todavia, essa possibilidade é difícil de ser estudada nos modelos de colite quimicamente induzida, pois a ruptura das junções aderentes pode ocorrer pela exposição das mesmas diretamente aos agentes indutores da colite (TNBS, ácido acético, DSS).

Recentemente investigou-se experimentalmente a relação entre estresse oxidativo tecidual e o conteúdo e padrão de expressão das proteínas E-caderina e β -catenina em modelo experimental de CE (KADRI, 2010; MARTINEZ, 2010; FABRIS, 2011; MARTINEZ et al., 2012; KADRI et al., 2013). Constatou-se que o conteúdo de ambas as proteínas reduz na superfície epitelial do cólon excluído e que a expressão da proteína β -catenina (responsável pela indução da expressão de genes relacionando a divisão celular) aumentava na região proliferativa das criptas cólicas, responsáveis pela reposição celular do epitélio danificado.

2.3 Colite de exclusão

A CE caracteriza-se pela presença de processo inflamatório localizado na mucosa intestinal, de segmentos do cólon ou reto desprovidos de trânsito fecal. Foi descrita em 1981 e a partir de então, com o aumento da incidência do câncer colorretal (CCR), DII, diverticulite e com o aumento da violência nos grandes centros, vêm sendo diagnosticada com maior frequência (GLOTZER et al., 1981; KELI et al., 1997; EDWARDS; GEORGE; WARREN, 1999). É provável que a verdadeira incidência da CE se encontre subestimada ao constatar-se que o trânsito intestinal somente é restabelecido entre 35,5% a 50% dos enfermos submetidos à colostomia temporária, condenando os restantes a conviverem pelo resto de suas vidas com o estoma e os limitantes sintomas da CE (ROIG et al., 2011; HODGSON et al., 2015). Naqueles pacientes cujo trânsito é restabelecido, a média de tempo para a reconstituição intestinal é de oito meses, tempo mais do que necessário para o surgimento da CE (HABR-GAMA et al., 1997). A CE é diagnosticada em 91% dos pacientes submetidos a exame endoscópico sistemático do cólon excluído após três meses da confecção do estoma e, em 52% deles, apresenta-se com intensidade leve, 40% moderada e em 8% grave limitando, consideravelmente, a qualidade de vida (WHELAN et al., 1994).

O quadro clínico encontra-se diretamente relacionado à extensão do segmento excluído de trânsito e ao tempo de exclusão fecal. Estima-se que, em média, 95% dos doentes desenvolvam sintomas após 36 meses da derivação (DAVID et al., 2009). Nos casos iniciais, a CE pode evoluir de forma pouco sintomática, contudo, clinicamente, a maioria dos doentes queixa-se da eliminação de sangue e muco pelo cólon excluído, dor abdominal e tenesmo (LU et al., 1995).

O exame endoscópico mostra mucosa cólica hiperemiada, congesta, edemaciada, friável com apagamento dos vasos sanguíneos da submucosa. Nos casos graves encontram-se úlceras aftóides indistinguíveis daquelas encontradas na retocolite ulcerativa inespecífica. Tais aspectos tornam o diagnóstico diferencial problemático, sobretudo nos pacientes submetidos ao desvio de trânsito por complicações das DII (GERAGHTY, TALBOT, 1991).

Microscopicamente a parede cólica dos portadores de CE mostra uma variedade de aspectos histológicos, porém sem nenhuma alteração característica (SOUZA, 2009; SOUZA et al., 2008). Na maioria deles, observa-se infiltrado inflamatório crônico acompanhado ou não de alterações da morfologia das glândulas cólicas. Existem alterações na superfície epitelial onde as células encontram-se afastadas, formando soluções de continuidade no espaço intercelular. O índice de apoptose nas células da superfície apical é maior quando comparado ao da mucosa provida de trânsito fecal. Detectam-se abscessos nas criptas intestinais nos locais que recobrem áreas com hiperplasia linfóide nodular, considerada a alteração histológica mais característica (Fig.8) (MURRAY et al., 1987; YEONG et al., 1991). O desenvolvimento de displasias nas criptas pode ser encontrado, mas, curiosamente, de modo distinto ao que ocorre nos portadores de retocolite ulcerativa, o desenvolvimento de neoplasias epiteliais nos segmentos excluídos de trânsito, por doenças distintas das DII ou CCR, é incomum (SOUZA et al., 2008; SOUZA et al., 2009). Uma das possíveis explicações para esse menor risco, relaciona-se ao fato de que nos portadores de CE a agressão à mucosa por agentes químicos e biológicos é menor devido à exclusão fecal.

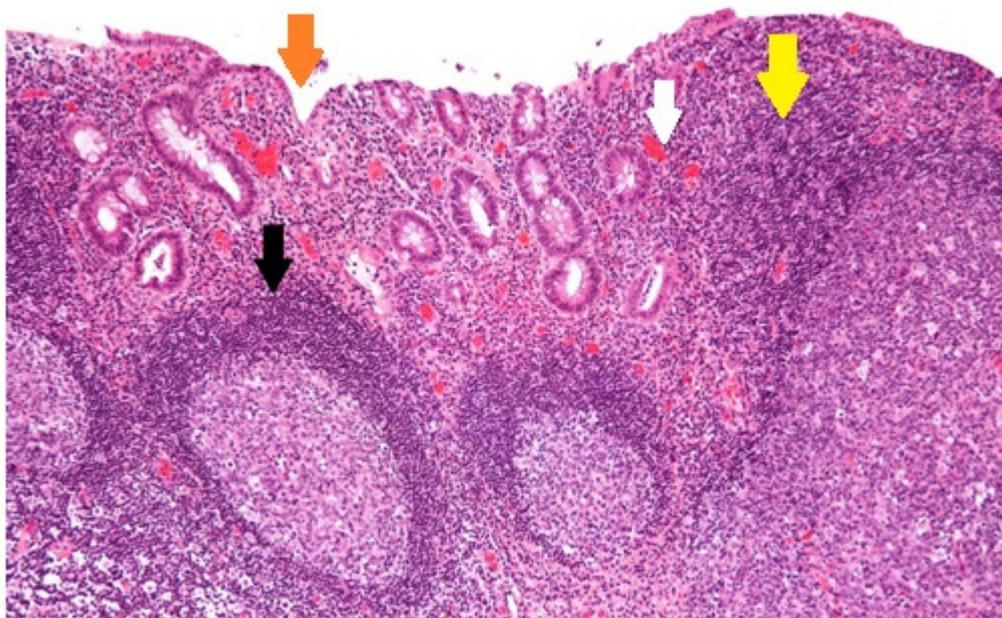


Figura 8- Segmento da parede cólica obtido um paciente com CE. Existe perda epitelial na superfície mucosa (seta vermelha), infiltrado inflamatório (seta amarela), congestão vascular (seta branca) e hiperplasia linfóide nodular (seta preta). (H.E. 100×).

O Laboratório de Investigação Médica da Universidade São Francisco, há mais de 10 anos vem estudando as principais alterações histológicas em modelo experimental de CE (SOUZA, 2008; SOUZA et al., 2009). Os resultados dessa linha de pesquisa vêm mostrando que a exclusão do trânsito fecal, ocasiona alterações histológicas nas diferentes camadas que compõe a parede cólica. No cólon excluído de trânsito, demonstrou-se redução significativa da altura das glândulas cólicas, aumento da espessura das camadas muscular da mucosa e submucosa, maior grau de inflamação e formação de ulcerações epiteliais. Todas essas alterações mostravam-se relacionadas ao tempo de exclusão fecal (SOUZA, 2008; SOUZA et al, 2009). Posteriormente, com o objetivo de verificar se a derivação do trânsito fecal interferia no conteúdo e padrão de expressão da camada de muco que recobre o epitélio intestinal e que representa sua primeira linha de defesa, avaliou-se a população de células caliciformes e o padrão histoquímico da expressão dos principais tipos e subtipos de mucinas, comparando segmentos com e sem trânsito fecal. Constatou-se, comparando o número de células caliciformes presentes nas glândulas cólicas em segmentos com e sem trânsito fecal, que ocorria redução significativa da população dessas células no cólon desprovido de trânsito fecal (MELLO et al., 2012). A diminuição no número de células caliciformes reduzia conteúdo e modificava o padrão de expressão de mucinas neutras e

ácidas nas glândulas intestinais (NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009). Essa redução se dava principalmente à custa das mucinas ácidas (NONOSE et al., 2009). Posteriormente, com o objetivo de avaliar, isoladamente, os subtipos de mucinas ácidas (sialomucinas e sulfomucinas), comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal, mostrou-se que havia redução significativa na quantidade de ambos os subtipos nos segmentos sem trânsito, existindo predomínio das sulfomucinas e desaparecimento das sialomucinas (MARTINEZ et al., 2010a). Cabe destacar que este padrão de expressão das mucinas na CE é diametralmente oposto ao encontrado na colite ulcerativa e no CCR, onde existe predomínio de sialomucinas. É possível que essa diferença possa ser considerada como um aspecto peculiar da CE (KELI et al., 1997). O resultado desse estudo sugeriu que a modificação no padrão de expressão tecidual dos subtipos de mucinas ácidas - desaparecimento das sialomucinas - pudesse ser considerada um marcador histoquímico promissor para o diagnóstico histológico da CE (MARTINEZ et al., 2010a).

Os mecanismos etiopatogênicos da CE ainda não se encontram totalmente esclarecidos. Estudos vêm demonstrando, a semelhança do que ocorre na retocolite ulcerativa, a importância dos AGCC na prevenção e tratamento da CE (NEUT et al., 1995; MORTENSEN, CLAUSEN, 1996; SCHEPPACH et al., 1997; KIELY et al., 2001). Os AGCC são formados a partir da fermentação de fibras vegetais dietéticas por bactérias existentes na luz intestinal. Representam a principal fonte energética para as células epiteliais da mucosa cólica. Assim sendo, a nutrição da mucosa ocorre, principalmente, pela absorção e metabolização dos AGCC provenientes da luz intestinal. Como fonte energética à mucosa intestinal os AGCC possuem papel mais importante que o substrato fornecido a partir do suprimento sanguíneo, respondendo por 80% de todo combustível energético fornecido à mucosa intestinal (ROEDIGER, 1990). A derivação do trânsito intestinal impede a passagem dos AGCC para o segmento excluído, fazendo com que as células epiteliais não possam dispor de seu principal substrato nutritivo. Com isso, as células passam a usar a glutamina, como fonte energética alternativa, oferecida pela circulação sistêmica (VELAZQUEZ et al., 1997). Todavia, o suprimento sanguíneo parece ser incapaz de assegurar todo substrato energético necessário, ocasionando alterações importantes no metabolismo bioquímico para obtenção de energia (fosforilação oxidativa). Essa alteração metabólica aumenta a formação de RLO e radicais livres de nitrogênio, substâncias tóxicas e determinantes da agressão inflamatória tecidual. A melhora clínica e histológica da CE, após restabelecimento do trânsito intestinal ou administração de enemas com AGCC no segmento excluído, reforça essa evidência (OLIVEIRA-NETO e AGUILAR-NASCIMENTO, 2004; NASSRI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; PACHECO et al., 2012).

Dentre os AGCC, o butirato representa o substrato energético mais importante. No cólon distal, sua absorção ocorre predominantemente por difusão passiva possuindo importante papel na prevenção de algumas formas de colite. Os AGCC estimulam o crescimento normal das células do epitélio cólico, influenciam a motilidade, aumentam o fluxo sanguíneo mucoso e favorecem a cicatrização de lesões da parede intestinal. Já se demonstrou a influência dos AGCC na melhora das alterações histológicas em modelos experimentais de CE (OLIVEIRA-NETO E AGUILAR-NASCIMENTO, 2004; NASSRI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; PACHECO et al., 2012). Todos esses aspectos reforçam a importância dos AGCC no tratamento e prevenção das DII. É possível que a reconstrução do trânsito intestinal, restabelecendo o fornecimento de AGCC, restitua os mecanismos habituais de obtenção energética pelas células, diminuindo a formação de RLO e, conseqüentemente, o dano inflamatório a mucosa cólica (MARTINEZ, 2010). Os AGCC parecem também exercer papel protetor no desenvolvimento de neoplasias pois, em virtude de sua ação antioxidante, reduz o dano ao DNA das células epiteliais (SERIL et al., 2003).

Recentemente foi proposto que o mecanismo inicial responsável pela lesão do epitélio cólico em doentes com retocolite ulcerativa encontra-se relacionado à produção de níveis elevados de RLO pela própria célula epitelial da mucosa cólica com alterações de seu metabolismo energético celular (PRAVDA, 2005). Esta possibilidade foi confirmada quando se mostrou que nos segmentos excluídos de trânsito fecal, existe aumento significativo da produção de RLO (MARTINEZ et al., 2010b). O estresse oxidativo resultante piora a inflamação na parede cólica e relaciona-se a quebra das moléculas de adesão intercelular celular, ocasionando redução no conteúdo das proteínas das junções de oclusão (claudina e ocludina) e das junções aderentes (E-caderina e β -catenina) nas glândulas cólicas (FABRIS, 2011; MARTINEZ et al., 2012; KADRI, 2010; KADRI et al., 2013; MARTINEZ et al., 2014). Todas essas evidências sugerem que o estresse oxidativo provoca ruptura dos diferentes mecanismos de defesa morfológica que compõem a barreira mucosa cólica. A semelhança do que ocorre na CE, outros estudos também encontraram alterações nas proteínas de adesão celular em portadores de retocolite ulcerativa (MEES et al., 2009). A melhora das alterações histológicas da mucosa excluída de trânsito após a administração tópica de substâncias com ação antioxidante é uma evidência considerável para a ação dos RLO sobre os sistemas de adesão intercelular (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al., 2011; CUNHA et al., 2011; MARTINEZ et al., 2013).

2.4 Colite e estresse oxidativo

A literatura atual vem dando importância crescente ao papel dos RLO na etiopatogenia de diversas inflamatórias e neoplásicas (SHAMI; MOREIRA, 2004). Nos últimos anos demonstrou-se, de maneira inequívoca, que os RLO estão relacionados à etiopatogenia das DII representadas, principalmente, pela retocolite ulcerativa (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; PRAVDA, 2005; BERRA; MENK, 2006; MOEINIAN et al., 2014; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014). A relação entre RLO e DII vem despertando cada vez mais curiosidade, fazendo com que cada vez mais estudos avaliem o papel dos RLO nas etapas iniciais da agressão a mucosa intestinal em portadores dessas enfermidades (SHEENAN; BRYNJOLFSSON, 1960; BONDY; LE BEL, 1993; CADENAS; DAVIES, 2000; CETINKAYA et al., 2005; SIES, 2014).

Os RLO são constantemente formados durante o metabolismo energético das células vivas. Habitualmente, a célula possui defesas antioxidantes naturais, enzimáticas e não enzimáticas, que atuam contra a toxicidade desses radicais sendo responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre a produção e eliminação dos agentes oxidantes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BERRA; MENK, 2006). Todavia, em certas condições, quer pela diminuição da capacidade antioxidante do organismo, quer pelo aumento exagerado na produção de RLO, ocorre desequilíbrio determinando o aparecimento de fenômeno conhecido como estresse oxidativo (MARTINEZ et al., 2010b). Já se demonstrou que os sistemas antioxidantes existentes na mucosa do cólon são deficientes, quando comparado ao de outros órgãos e tecidos, determinando maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo (THAM; WITHIN; COHEN, 2002). A possibilidade de a colite ser ocasionada por RLO já é conhecida há vários anos, quando se verificou que a infusão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um potente formador de RLO, no interior do cólon e reto, é seguida por grave quadro de colite, histologicamente muito semelhante à retocolite ulcerativa e a CE (HOFFMANN et al., 2003; MARQUES et al., 2010).

Teorias relacionando a etiopatogenia da retocolite ulcerativa a distúrbios imunológicos foram propostas, contudo, todas falharam em explicar, claramente, os mecanismos iniciais envolvidos na agressão inicial ao epitélio cólico (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002). Essas teorias não apresentaram bases experimentais concretas para esclarecer o mecanismo inicial de agressão ao epitelial e não foram capazes de explicar todos os aspectos histológicos e bioquímicos desencadeantes da doença. Apesar do infiltrado inflamatório celular ter sido encontrado na maioria dos portadores de retocolite ulcerativa,

não existia uma teoria capaz de explicar satisfatoriamente o mecanismo de quebra da eficiente barreira epitelial, que possibilitaria a migração de bactérias para o interior da camada submucosa e a conseqüente deflagração da resposta inflamatória. Diante destas evidências, em 2005, foi proposta a Teoria por Indução de Radicais (*Radical Induction Theory*) para explicar os fenômenos iniciais que precedem à infiltração inflamatória da mucosa intestinal em portadores de retocolite ulcerativa (PRAVDA, 2005). Segundo o autor, a agressão inicial a mucosa desencadeadora da doença é atribuída à produção aumentada de RLO, pela própria célula epitelial da mucosa com modificações em seu metabolismo energético. Essa produção aumentada de RLO, aliada as deficiências do sistema antioxidante intracelular do cólon, possibilita a formação exagerada do radical hidroxil OH^\cdot . O radical OH^\cdot em excesso, difundindo-se pelo interior da célula, ocasiona lesão das diferentes linhas de defesa da barreira, permitindo a migração de antígenos e bactérias existentes no interior da luz intestinal para a intimidade da submucosa estéril (PRAVDA, 2005). Na tentativa de combater a infiltração bacteriana, leucócitos migram para o interior da parede intestinal, dando origem ao processo inflamatório encontrado na doença. Enzimas citolíticas liberadas pelo processo inflamatório, aliadas a maior produção de RLO decorrentes da infiltração neutrofílica alterariam, ainda mais, a permeabilidade seletiva (MILLAR et al., 1996; SHERIDAN et al., 1996). Contudo, o próprio autor em seu artigo original, chamou a atenção para a dificuldade em demonstrar, com os modelos experimentais de colite habitualmente utilizados, as etapas iniciais de sua teoria (PRAVDA, 2005). Até então, nenhum modelo adotado para o estudo da retocolite ulcerativa era capaz de reproduzir, com fidelidade, as etapas iniciais da agressão à mucosa cólica. A maioria deles partia da agressão química ao epitélio mucoso, não levando em conta a possibilidade de que a formação aumentada de RLO, pela própria célula epitelial com metabolismo energético alterado, pudesse estar relacionada à agressão inicial. Nesses modelos a lesão da mucosa cólica é provocada pela infusão de substâncias químicas que destroem a barreira epitelial (HOFFMANN et al., 2003). Desse modo, modelos que empregam a infusão de ácido acético, H_2O_2 , sulfato de dextrana (DSS), ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) são limitados na sua capacidade de reproduzir a etapa inicial (produção aumentada de RLO pelas células epiteliais) que antecede a infiltração leucocitária. Todos esses modelos não consideram evidências recentes de que a agressão inicial surge a partir de distúrbios metabólicos da própria célula epitelial, representando, portanto, apenas etapas subsequentes da etiopatogenia da retocolite ulcerativa. Da mesma forma, por destruírem os mecanismos de adesão celular não permitem verificar se poderiam danificar as proteínas constituintes da barreira epitelial cólica.

Em 2008, foi proposto um modelo de colite baseado na supressão do fornecimento de AGCC a mucosa cólica (SOUSA et al., 2008). Neste modelo a agressão ao epitélio cólico era provocada apenas pela exclusão fecal, sem a instilação de qualquer agente lesivo (MARTINEZ et al., 2010b). Os resultados encontrados mostraram que a derivação do trânsito fecal aumentava significativamente a produção tecidual de RLO. O estresse oxidativo resultante estava relacionado às alterações histológicas características da CE e semelhantes às encontradas em formas leves de retocolite ulcerativa.

2.5 Colite de exclusão e estresse oxidativo

Apesar de serem consideradas entidades clinicamente distintas, a CE e a retocolite ulcerativa apresentam vários aspectos semelhantes quando se consideram a sintomatologia, aspectos endoscópicos, histológicos e as propostas terapêuticas. O denominador comum de ambas é o intenso processo inflamatório na mucosa cólica que piora com o passar do tempo. A CE vem sendo considerada como uma síndrome de deficiência nutricional das células epiteliais. Reforça essa possibilidade, resultados de estudos experimentais demonstrando que a interferência no metabolismo normal dos colonócitos, pelo uso dos inibidores da β -oxidação dos AGCC, pode ser um dos eventos iniciais no aparecimento da colite e que os RLO se encontram relacionados à colite experimental (AGARWAL; SCHIMMEL, 1989; CHRISTL et al., 1996). As semelhanças se tornam mais claras ao se constatar que a infusão de agentes nutrientes como o butirato ou antioxidantes como o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) e a n-acetilcisteína (NAC) é estratégia terapêutica eficaz no tratamento de ambas as enfermidades (TRIANAFILLIDIS et al., 1991; TRIPODI; GORCEY; BURAKOFF, 1992; LIU et al., 2001; CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al., 2011; MARTINEZ et al, 2013). Da mesma forma, quando se utilizou o sucralfato, substância que também possui ação antioxidante e cicatrizante tecidual verificou-se melhora das alterações histológicas na CE experimental (PEREIRA et al., 2013; CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA et al, 2015). Recentemente demonstrou-se que a aplicação de enemas com sucralfato, além de reduzir a infiltração neutrofílica na mucosa do cólon excluído, diminuiu os níveis de estresse oxidativo tecidual (MARTINEZ et al., 2015b). Essas evidências sugerem, no mínimo, a existência de bases etiopatogênicas semelhantes entre CE e colite ulcerativa. Contudo, estudos experimentais e em seres humanos geralmente limitam-se à análise qualitativa e quantitativa das alterações histológicas encontradas na CE, ou a eficácia de várias substâncias no tratamento da

doença. Não levam em conta que as alterações histológicas que se desenvolvem na CE, modificações da barreira de muco que recobre o epitélio cólico e a ruptura das proteínas das junções de oclusão e de aderência possam estar relacionadas aos maiores níveis de estresse oxidativo. Diante dessa evidência, aventou-se a possibilidade de avaliar a ação de várias substâncias antioxidantes com intuito de verificar se elas poderiam, diminuindo o estresse oxidativo tecidual, preservar a integridade da barreira epitelial e, conseqüentemente, evitar o desenvolvimento da CE.

Inicialmente foram testadas duas substâncias sintéticas, o 5-ASA e a NAC em modelo experimental de CE. Constatou-se que a aplicação de enemas com ambas as substâncias reduziam os níveis de dano oxidativo e melhoravam, significativamente, o grau de inflamação tecidual (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al, 2011; MARTINEZ et al., 2013). A melhora da inflamação estava relacionada à concentração utilizada das substâncias, bem como ao tempo de intervenção. Contudo, o uso do 5-ASA e da NAC apresenta como principais limitações seu custo e efeitos colaterais (CALTABIANO et al., 2011). Com o objetivo de testar substâncias com menor custo e efeitos colaterais avaliaram-se os efeitos antioxidantes de extratos naturais. Inicialmente estudaram-se os efeitos da aplicação por enemas contendo extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. Verificou-se que a substância apresentava efeitos terapêuticos reduzindo os níveis teciduais de estresse oxidativo e melhorando as alterações histológicas (CUNHA et al., 2011).

Recentemente, uma série de estudos vem demonstrando que a curcumina, substância obtida a partir do processamento do rizoma da *Curcuma longa*, por sua destacada ação antioxidante e anti-inflamatória vem sendo utilizada tanto em modelos de colite quimicamente induzida, quanto em portadores de DII. Esses estudos vêm mostrando 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). É possível que a ação antioxidante da substância possa neutralizar a maior produção de RLO pelas células da mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal, preservando a integridade dos mecanismos de defesa da barreira epitelial cólica e, em particular, das moléculas de adesão celular. Entretanto, a curcumina ainda não foi testada em modelos de CE.

2.6 *Curcuma longa* (curcumina)

A *Curcuma longa* (*Curcuma longa* L.) é uma planta herbácea, perene, pertencente à ordem das *Zingiberales* e da família *Zingiberaceae* (MAY et al., 2005). A planta é originária do sudeste da Ásia (Índia e Indonésia), tendo sido introduzida no Brasil na década de 80 (ALMEIDA, 2006). A planta atinge em média 120 a 150 centímetros de altura em condições favoráveis de clima e solo. As folhas são grandes e emanam um perfume agradável quando amassadas. Possuem pecíolos tão compridos quanto os limbos, que reunidos em sua base formam o pseudocaule. O rizoma é a região mais importante e de interesse comercial da planta, pois é dela que se extraem diferentes substâncias com propriedades farmacológicas (Fig.9) (ALMEIDA, 2006). O rizoma externamente apresenta uma coloração esbranquiçada ou acinzentada e internamente uma coloração amarelada (as vezes alaranjada) intensa. Do rizoma saem as folhas com ramificações laterais compridas e as hastes florais (Fig. 10).

O cultivo da *Curcuma longa* é relativamente fácil de ser feito. Depois de adaptada ao local, a cultura da planta se alastra facilmente, pois o rizoma principal emite numerosos rizomas laterais. A *Curcuma longa* uma planta muito resistente e difícil de ser destruída. A colheita deve ocorrer na época em que a planta perde a parte aérea, depois da floração. Nesta fase, os rizomas apresentam pigmentos amarelos intensos. A planta reproduz-se por pedaços dos rizomas que apresentam gemas (olhos) com plantio em solo argiloso, fértil e de fácil drenagem. A *Curcuma longa* também é conhecida popularmente com outros nomes sendo os mais utilizados açafão-da-índia, açafroa, tumérico, mangarataia, batatinha amarela, gengibre dourado e gengibre amarelo.



Figura 9- *Curcuma longa*: caule folhas, rizoma e seu extrato



Figura 10 - Plantação de *Curcuma longa* no Brasil

O principal composto obtido do extrato obtido do rizoma da *Curcuma longa* T. é conhecido como curcumina ou diferuloilmetano. O pigmento, de fórmula química 1*E*,6*E*)-1,7-bis-(4-idrossi-3-metossifenil)-epta-1,6-dien-3,5-dione 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 (Fig.11). A curcumina foi inicialmente identificada por Lampe e Milobedzka em 1910 (JURENKA, 2009). Na realidade são três os pigmentos presentes no extrato da raiz da planta: curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, nas proporções de 60%, 22% e 18%, respectivamente (ALMEIDA, 2006). O extrato da planta possui uma concentração 18 vezes maior dos compostos naturais quando comparado aos encontrados na raiz da planta nativa. A curcumina, o pigmento presente em maior quantidade, é comumente usada como corante para comida sendo um dos ingredientes contidos no pó de curry, especiaria muito utilizada na culinária indiana. O extrato do rizoma ainda apresenta óleos voláteis (tumerone, atlantone e zigerone) e resinas (JURENKA, 2009).

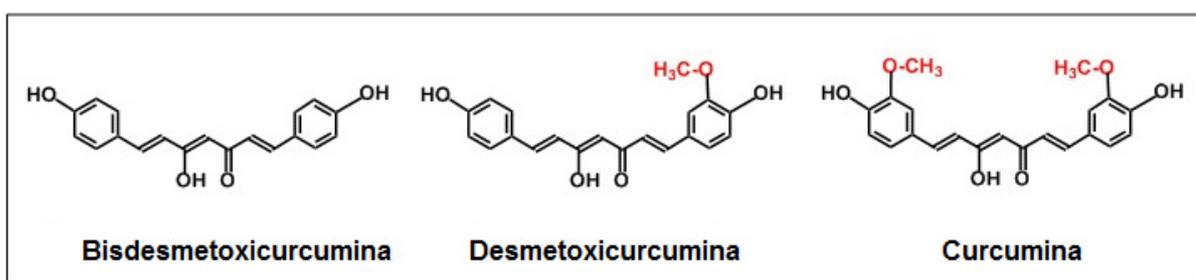


Figura 11 - Fórmulas químicas estruturais dos principais pigmentos encontrados no extrato de *Curcuma longa*.

O quadro 1 mostra as principais substâncias encontradas no extrato de *Curcuma longa*.

Quadro 1- Principais substâncias encontradas no extrato de <i>Curcuma longa</i> (quantidade por 100g do extrato)	
<i>Calorias</i>	354
<i>Lipídios</i>	10g
<i>Gordura saturada</i>	3,1g
<i>Gordura poliinsaturada</i>	2,2g
<i>Gordura monoinsaturada</i>	1,7g
<i>Colesterol</i>	0
<i>Sódio</i>	38mg
<i>Potássio</i>	2.525mg
<i>Cálcio</i>	183mg
<i>Magnésio</i>	193mg
<i>Carboidratos</i>	65g
<i>Fibras dietéticas</i>	21g
<i>Proteínas</i>	8g
<i>Açúcar</i>	3,2g
<i>Ácido ascórbico</i>	25,9 mg
<i>Ferro</i>	41,4 mg
<i>Vitamina B6</i>	1,8 mg

O incentivo à utilização da curcumina como substância com propriedades medicinais, é apoiado quase que exclusivamente por sua secular utilização como medicamento natural com propriedades anti-inflamatórias pela medicina Ayurvédica (FOLTZ-GRAY, 2005; JURENKA, 2009). Diversas propriedades medicinais têm sido atribuídas ao extrato da *Curcuma longa*. Na Índia, a planta tem sido usada há séculos, como medicamento para o

tratamento de dermatites, doenças dispépticas, doenças musculares e artrite (CHANDRA, GUPTA, 1972; ALMEIDA, 2006; JURENKA, 2008). Na China, a curcumina é utilizada como analgésico, antifisético, antiespasmódico e vermífugo (JURENKA, 2009). Na Europa, a curcumina já foi utilizada no tratamento da dispepsia, uveíte 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 em animais de experimentação, artrite experimentalmente induzida, osteoartrite, diabetes e, principalmente, câncer do fígado e colorretal (SHAKIBAEI et al., 2013; XU et al., 2013; AHMED; GILANI, 2014; CHUENG SAMARN et al., 2014; MOURTAS et al., 2014; NEERATI; DEVDE; GANGI, 2014; NONOSE, 2011; NONOSE et al., 2014; PANAHI et al., 2014; WANG et al., 2014; ZANG et al., 2014; ZHAO et al., 2014). O diferuloilmetano, princípio ativo da curcumina, é um polifenol natural isolado do rizoma da planta *Curcuma longa* que apresenta importante ação antioxidante por remover RLO formados durante a resposta inflamatória. Nos últimos anos, extensas pesquisas *in vitro* e *in vivo* vêm sugerindo que por essa ação antioxidante a substância possui efeito anticarcinogênico sendo capaz de reduzir o dano oxidativo ao DNA celular e, conseqüentemente o desenvolvimento de mutações, bem como reduzir a expressão nuclear de β -catenina e citocinas pró-inflamatórias (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 12 ilustra as principais enfermidades onde a curcumina mostrou efeitos terapêuticos benéficos.

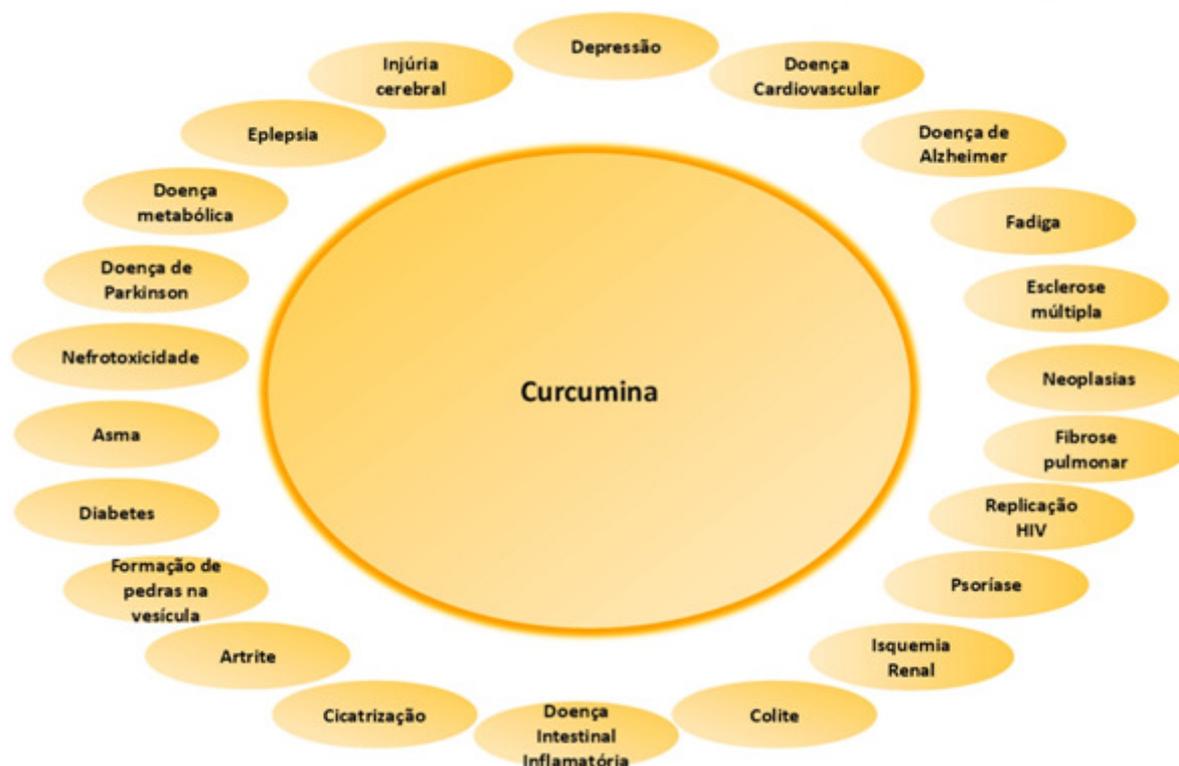


Figura 12 - Potenciais efeitos terapêuticos da curcumina (Modificado de AGGARWAL; SUNG, 2008)

Disponível: <http://www.homeoterapica.com.br/noticias.php?noticia=7>

Sugimoto et al., (2002), foram os primeiros autores a avaliarem em camundongos os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da curcumina em modelo de colite induzida por TNBS. Os autores verificaram que a administração oral de curcumina preveniu e melhorou as alterações inflamatórias na colite experimental, sugerindo que a substância poderia apresentar potencial efeito terapêutico para o tratamento de doentes com DII. A partir deste estudo pioneiro, uma série de autores avaliaram os efeitos da curcumina isolada ou associada a outras substâncias com potencial anti-inflamatório em diferentes modelos experimentais de colite quimicamente induzida (SALH et al., 2003; UKIL et al., 2003; JIANG et al., 2006; ZHANG et al., 2006a; ZHANG et al., 2006b; CAMACHO-BARQUERO et al., 2007; DEGUCCI et al., 2007; MARTELLI et al., 2007; VENKATARANGANNA et al., 2007; BILLEREY-LARMONIER et al., 2008; LARMONIER et al., 2008; ARAFA et al., 2009; LUBBAD; ORIOWO; KHAN, 2009a; LUBBAD; ORIOWO; KHAN, 2009b; NONES et al., 2009; YADAV et al., 2009; UNG et al., 2010; LARMONIER et al., 2011; VILLEGAS; SÁNCHEZ-FIDALGO; DE LA LASTRA, 2011; MIDURA-KIELA et al., 2012; MOUZAOU; RAHIM;

DJERDJOURI, 2012; LIU et al., 2013; TOPCU-TARLADACALISIR et al., 2013; YANG et al., 2013; ZENG et al., 2013).

Esses estudos de uma maneira geral mostraram a curcumina apresenta múltiplos mecanismos de ação. A substância apresenta um eficiente mecanismo antioxidante, tanto removendo do tecido RLO produzidos em excesso (*scavenging free radicals*) quanto aumentando e estimulando a ação dos sistemas antioxidantes teciduais. A curcumina interfere em múltiplas vias de sinalização celular, particularmente as vias da quinases. Reduz a produção tecidual de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β), inibe a infiltração neutrofílica, reduzindo a atividade da mieloperoxidase (MPO) nos tecidos. Da mesma forma reduz a atividade da COX-1, COX-2, PGE-2, PCR, TNF- α , IFN- γ , iNOS e, principalmente, inibe o fator de transcrição NF- κ B (BALIGA et al., 2012). Estudos ainda mostram que a curcumina é capaz de modular proteínas relacionadas aos mecanismos de adesão celular (GUPTA et al., 2013). Nas últimas décadas estudos clínicos também vêm mostrando que a administração de curcumina associada às drogas habitualmente empregadas para o tratamento das DII (mesalazina ou sulfasalazina) é eficaz, bem tolerada e capaz de ajudar na manutenção de uma remissão clínica sustentada, prevenindo recidivas da doença e reduzindo seus índices de atividade (BALIGA et al., 2012). Um recente estudo duplo cego e randomizado avaliou os efeitos a aplicação de enemas contendo curcumina associada à administração oral do ácido 5-ASA, em doentes com colite ulcerativa distal com atividade moderada. Os resultados mostraram que houve remissão clínica do quadro inflamatório após oito semanas em 43,4% do grupo tratado com a associação e em apenas 22,7% dos doentes do grupo controle que receberam clisteres com SF 0,9% e ácido 5-ASA por via oral. Verificaram uma melhora endoscópica em 52,2% dos doentes do grupo da curcumina comparada com 36,4% do grupo controle. O grupo tratado com curcumina apresentou melhor evolução em termos de resposta clínica (92,9% vs. 50%), remissão clínica (71,4% vs. 31,3%) melhora endoscópica (85,7% vs. 50%). Os autores concluem que a utilização de enemas contendo curcumina resulta em grande melhora nos índices de atividade da doença em portadores de colite distal moderada (SINGLA et al., 2014).

Apesar de se demonstrar os benefícios da aplicação de enemas com curcumina em modelos experimentais de colite quimicamente induzida e em portadores de DII, nenhum estudo avaliou os efeitos tópicos da substância em modelos experimentais ou em doentes portadores de CE. Da mesma forma, apesar de já ter sido demonstrado os efeitos da curcumina em modular a expressão tecidual das proteínas E-caderina e β -catenina em doentes com câncer de mama e colorretal a ação da substância não foi avaliada em modelos de CE (JAISWAL et al., 2002; PRASAD et al., 2009; MUKHERJEE et al., 2014).

Quando se considera que estresse oxidativo tecidual consequente a maior produção de RLO pelas células sem suprimento de AGCC é um dos mecanismos etiopatogênicos da CE por determinar a quebra das proteínas constituintes dos sistemas de junções intercelulares (E-caderina, β -catenina, claudina-3 e ocludina), é possível que os efeitos antioxidantes da curcumina possam evitar a ruptura desses sistemas e preservar o conteúdo tecidual dessas proteínas no epitélio cólico. Todavia, essa possibilidade, no melhor do nosso conhecimento, ainda não foi estudada.

2.7 Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma proteína (enzima) catiônica, com peso molecular de 144kD, formada por dois dímeros idênticos ligados entre si por pontes de bissulfeto, sendo cada dímero composto de uma subunidade de cadeia leve e uma pesada, com grupos heme funcionalmente idênticos. É a principal proteína constituinte dos granulos azurófilos dos neutrófilos (85%-90% e o restante em monócitos). Após o recrutamento de neutrófilos para um foco de invasão bacteriana a MPO é prontamente liberada após ativação por agonistas distintos da degranulação neutrofílica. A MPO, por meio de reações com o H_2O_2 , forma RLO e outras substâncias oxidantes difusíveis com atividade bactericida.

A enzima possui papel fundamental na produção de RLO e existem evidências de que alguns metabólitos gerados a partir de reações químicas catalizadas pela MPO possam estar envolvidos em mecanismos de sinalização celular. Dentre os principais produtos formados a partir da reação da MPO encontra-se o RLO oxigênio singlete, um tipo de radical importante no combate a patógenos intracelulares. Por aumentar à produção de RLO nos tecidos a enzima pode provocar estresse oxidativo tecidual aumentando a intensidade da lesão tecidual (MARTINEZ et al., 2015b).

A dosagem tecidual da MPO é utilizada como um marcador específico para a avaliação da presença de infiltrado neutrofílico nos tecidos inflamados (LONGATTI et al., 2010; MARTINEZ, 2015b). Seus valores traduzem indiretamente a atividade do processo inflamatório. A medida do conteúdo tecidual da MPO vem sendo utilizada em vários trabalhos clínicos e experimentais, que estudaram a intensidade do processo inflamatório, bem como a ação de diferentes substâncias na melhora do índice de atividade inflamatória de doentes ou modelos experimentais de colite (LONGATTI et al., 2010). Existem vários métodos descritos para a avaliação dos níveis teciduais de MPO, todavia, a maioria deles, deriva do método descrito por Bradley, Christensen e Rothstein (1982). Neste estudo optou-

se por avaliar a expressão tecidual da MPO por meio de técnica imunoistoquímica. Achou-se interessante avaliar o local da parede cólica onde existia predomínio do infiltrado neutrofílico, o que não poderia ser feito utilizando-se um ensaio bioquímico. Outros motivos para escolha do método imuno-istoquímico foi à familiaridade adquirida com a técnica, bem como a possibilidade de quantificar-se seu conteúdo tecidual por morfometria computadorizada (MARTINEZ et al., 2015b).

3 OBJETIVOS

1. Avaliar, em modelo experimental de CE, os efeitos da aplicação tópica do extrato oleoso de *Curcuma longa* no conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina e β -catenina nas glândulas da mucosa cólica exclusiva de trânsito fecal;

2. Verificar se existe relação entre a concentração utilizada do extrato oleoso de *Curcuma longa* e o conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina, β -catenina e MPO nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal;

3. Verificar a influência do tempo de intervenção tópica com extrato oleoso de *Curcuma longa* nas alterações inflamatórias e no infiltrado neutrofílico em modelo experimental de CE.

4. Avaliar o potencial efeito terapêutico da aplicação tópica de extrato oleoso de *Curcuma longa* no tratamento da CE experimental.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Aspectos éticos

Este estudo obedeceu às recomendações da lei Federal Nº. 11.794 e as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O Projeto de Pesquisa recebeu a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Francisco (Projeto Nº 22.11/07). A cópia do parecer encontra-se no ANEXO I.

4.2 Animais de experimentação

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos, pesando entre 300 e 350 g provenientes do Biotério Central da Universidade São Francisco.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, com controle de temperatura, luminosidade, umidade e ruídos. Na véspera da intervenção cirúrgica, permaneceram em jejum durante 12 horas, exceto para água. As gaiolas foram identificadas com o número, grupo e subgrupo experimental a que pertenciam e esses mesmos dados foram tatuados com tinta nanquim, na cauda de cada animal.

Os ratos foram alimentados sempre com a mesma ração, própria para roedores, e pesados semanalmente.

Nenhum animal morreu ou foi substituído durante o estudo.

4.3 Técnica Cirúrgica

A derivação do trânsito intestinal em todos os animais foi realizada sob anestesia geral pela administração intraperitoneal de 0,1 mL/100 g de 1:1 (v/v) solução de quetamina (50 mg/mL) e xilazina (20 mg/mL). Depois de anestesiados e fixos à mesa cirúrgica, foi realizada a tricotomia e a cavidade abdominal foi aberta por incisão longitudinal mediana

com 3 cm de extensão. A secção do cólon foi realizada 2 cm a jusante do ceco. Após a ligadura dos vasos da arcada marginal, seccionou-se o cólon direito no ponto escolhido, exteriorizando-se o segmento proximal, como colostomia terminal na fossa ilíaca direita, fixando-se a colostomia à pele com pontos separados de fio absorvível monofilamentar 5-0 nos quatro pontos cardinais, e entre eles. Concluída a fixação da colostomia proximal, o segmento caudal do cólon direito foi cateterizado e irrigado com 40 mL de solução fisiológica 0,9% (SF) a 37°C, até que o efluente drenado pelo ânus não mais apresentasse resíduos fecais (Fig. 13). Terminada a irrigação, o cateter foi removido e o cólon distal exteriorizado como uma fístula mucosa distal no hipocôndrio direito. O estoma distal foi fixado com a mesma técnica utilizada no proximal. A síntese da parede abdominal foi realizada em dois planos de sutura: peritônio e aponeurose com pontos contínuos de fio de nylon 4-0 e a pele com pontos separados com o mesmo fio.



Figura 13 – Limpeza mecânica anterógrada do cólon distal a ser excluído de trânsito fecal (seta)

4.4 Grupos experimentais

A Fig. 14 mostra o algoritmo de formação dos grupos experimentais. Os 36 animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais com 12 ratos cada. O primeiro grupo recebeu enemas retais diários contendo solução fisiológica a 0,9% (grupo controle). O segundo e o terceiro (grupos experimentais), receberam, diariamente, enemas contendo extrato oleoso de *Curcuma longa* (Sigma Aldrich do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) em duas concentrações diferentes: 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia, respectivamente. Em cada um dos grupos, seis animais foram sacrificados após duas semanas e os outros seis após quatro semanas de intervenção.

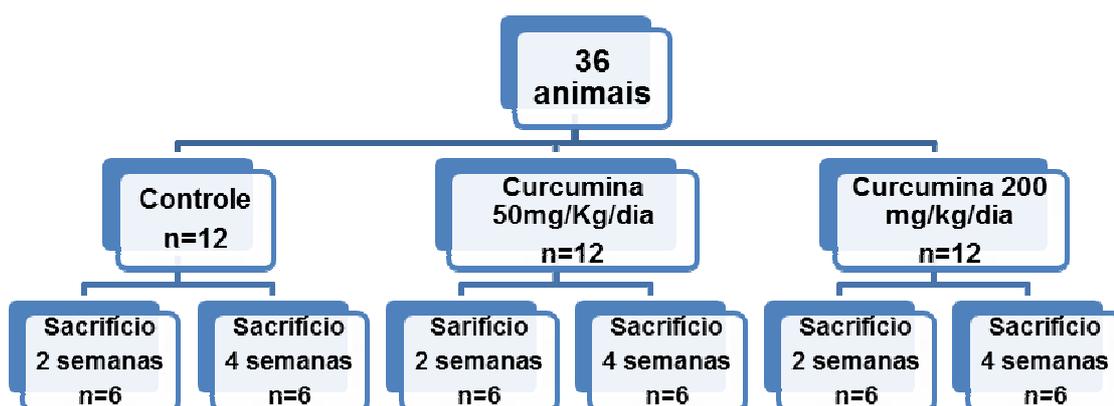


Figura 14 - Subdivisão dos grupos experimentais

4.5 Coleta de Amostras

Duas ou quatro semanas após a intervenção com as substâncias propostas, os animais pertencentes a cada grupo foram anestesiados com a mesma técnica descrita anteriormente. A cavidade abdominal foi reaberta, removendo-se todo cólon submetido à irrigação com as soluções de intervenção nas concentrações propostas. O espécime extirpado foi aberto longitudinalmente pela borda antimesentérica, lavado com SF a 37°C e

dividido longitudinalmente em dois fragmentos com 4 cm de comprimento. Os fragmentos longitudinais foram sempre retirados de uma distância padronizada e localizada 2 cm acima da placa de Peyer. Os dois fragmentos foram fixados com alfinetes em fragmento de cortiça com a superfície mucosa voltada para cima e, encaminhados para estudo histológico e histoquímico.

4.6 Análise histológica

4.6.1 Hematoxilina-eosina

As lâminas, obtidas dos animais do grupo controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal), foram submetidas a técnicas de coloração com hematoxilina-eosina (HE).

Para a realização da técnica da HE as lâminas após terem sido desparafinadas em dois banhos sucessivos de xilol, durando dez minutos cada banho, foram submetidas a três banhos sucessivos de álcool absoluto e hidratadas com água destilada. A seguir, foram expostas a hematoxilina de Harris filtrada em temperatura ambiente por um minuto. Após a exposição à hematoxilina de Harris foram submetidas à lavagem contínua e cuidadosa com água corrente e, posteriormente água destilada por três minutos cada etapa e expostas ao corante eosina por dois minutos a temperatura ambiente. A seguir foram inicialmente lavadas em água corrente e posteriormente em água destilada por mais dois minutos. Terminada esta etapa foram desidratadas em três banhos sucessivos de álcool absoluto, e diafanizadas em xilol. Terminada a diafanização às lâminas foram montadas com resina e lamínulas.

4.6.2 Técnica imunoistoquímica

Para realização da técnica imunohistoquímica para pesquisa das proteínas E-caderina, β -catenina, claudina-3, ocludina e MPO no bloco previamente confeccionado, foram realizados 4 cortes histológicos adicionais, com 5 μ de espessura em todas as amostras colhidas dos animais dos subgrupos controle, curcumina 50mg/kg/dia e

200mg/kg/dia) nos dois períodos de exclusão propostos. Os cortes foram dispostos em lâminas com margens foscas previamente identificadas com o grupo experimental, subgrupo, número do animal e local do cólon de onde o fragmento tinha sido removido. As lâminas foram desparafinadas, reidratadas em álcool em concentrações decrescentes (absoluto, 95%, 80% e 50%) e lavadas em água destilada. Depois da lavagem, as lâminas foram submersas em tampão fosfato (PBS) (0,05 M, pH 7,2) por 10 minutos e secas com papel filtro. Realizou-se bloqueio da atividade de peroxidases endógenas com H₂O₂ a 3% em câmara umidificada, à temperatura ambiente por 10 minutos, seguida por outra lavagem com PBS por mais 10 minutos. Realizou-se a recuperação antigênica em recipientes especiais contendo citrato de sódio 10 mM (pH 6,0) em um banho de água a 95°C por 45 minutos. A seguir, as lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos e, novamente lavadas em PBS por cinco minutos. Para pesquisa da expressão tecidual da E-caderina, as lâminas foram cobertas com anticorpo primário anti-E-caderina, específico de rato, diluído a 1:50 em albumina bovina (1%). Para realização da técnica imunoistoquímica para pesquisa da proteína β -catenina utilizou-se anticorpo primário monoclonal anti- β -catenina que reconhece a proteína murina também diluído à 1:50 em albumina bovina (1%). Para a avaliação da expressão tecidual da claudina-3 utilizou-se anticorpo primário monoclonal anti-claudina-3 diluído à 1:100 em albumina bovina (1%). Para a avaliação da expressão tecidual da ocludina utilizou-se anticorpo primário monoclonal ocludina que reconhece a proteína murina, também diluído à 1:50 em albumina bovina (1%). Para a avaliação da expressão tecidual da mieloperoxidase (MPO) utilizou-se anticorpo primário monoclonal anti-MPO que apresenta reatividade para a proteína murina, também diluído à 1:50 em albumina bovina (1%). As lâminas foram cobertas com 100 μ L das soluções contendo os anticorpos primários e mantidas em refrigeração à 4°C por 24 horas. As lâminas foram cobertas com 100 μ L das soluções contendo os anticorpos primários e mantidas em refrigeração à 4°C por 24 horas.

Concluída esta etapa, as lâminas previamente expostas ao respectivo anticorpo primário foram então lavadas com PBS, incubadas com anticorpo secundário e submetidas ao complexo de coloração estreptavidina-biotina-peroxidase por 45 minutos, preparado com uma diluição de 1:100 em PBS. As lâminas foram desenvolvidas usando solução recém-preparada contendo tetrahidrocloreto diaminobenzidina (DAB, 10 mg em 10 ml de PBS com 3 mL H₂O₂), que foi gotejada sobre as lâminas e incubada por três minutos. A seguir foram lavadas, e contra-coradas com verde de metila por um minuto e, novamente, lavadas em água destilada. Terminada a contra coloração, foram desidratadas por imersão em soluções

crenças de etanol (50%, 80%, 95% e 100%) e xileno. Finalmente, as lâminas foram montadas, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas.

Para as proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina e β -catenina a imunocoloração foi considerada positiva quando se detectava coloração acastanhada difusamente presente, com pontos de intensidade variável e distribuição homogênea na membrana apical, basolateral ou citoplasma das células. A coloração para a enzima MPO foi considerada positiva quando se encontrava neutrófilos corados com a coloração acastanhada. Como recomenda o fabricante, o controle negativo para a imunocoloração foi realizado sem a adição do anticorpo primário e o positivo em tecido de cólon humano, sabidamente positivo para as proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina e β -catenina. O controle positivo para a MPO foi realizado em segmento de apêndice vermiforme com apendicite aguda.

4.7 Graduação inflamatória

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Eclipse DS-50, Nikon Inc., Osaka, Japan), por um patologista experiente em DII, que não tinha conhecimento da origem do material e dos objetivos do estudo. Foram realizadas fotografias utilizando sistema digital de videocaptura (DS-Fi-50; Nikon Inc., Osaka, Japan) previamente acoplado ao microscópio. Para o diagnóstico de CE foram considerados os seguintes parâmetros histológicos: perda de superfície epitelial e intensidade do infiltrado inflamatório e infiltrado neutrofílico. Cada uma das duas variáveis foram estratificadas em: 0 = ausente; + = leve; ++ = moderada e +++ = grave. O valor da soma do resultado encontrado para variável, após leitura de três campos, formava o escore inflamatório 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. Adotou-se como resultado final para o escore inflamatório, em cada animal, a média obtida após a leitura de três campos distintos.

4.8 Quantificação do conteúdo das proteínas

O conteúdo tecidual total das proteínas E-caderina, β -catenina, claudina-3, ocludina e MPO foi mensurado por análise de imagem assistida por computador (morfometria computadorizada), quantificando-se o conteúdo de ambas, em três criptas cólicas contíguas em três campos aleatórios. A imagem selecionada, após adequadamente focada, foi capturada por videocâmara acoplada ao microscópico óptico, e analisada pelo programa NIS-Elements (versão 3.2) instalado em um computador com boa capacidade de processamento de imagens (Pentium 4 *dual-core*, 8 Gbyte de Memória RAM (*Random Access Memory*), dois Hard Disk de 1 Terabyte, placa de vídeo-captura ASUS).

A quantificação da proteína foi sempre realizada após a calibração do programa para o aumento selecionado. A calibração foi sempre refeita após a leitura de cada lâmina. Para a quantificação da densidade de cor encontrada em cada campo selecionado, foi utilizado o filtro RGB adotando-se todo comprimento de onda que continha a cor marrom (cor que identificava a imunopressão tecidual da proteína). Com o programa, transformou-se a coloração marrom, onde havia a imunopressão, na cor branca e o restante do campo de visão capturado, sem imunocoloração, em preto (Fig. 15 e Fig. 16). Os valores encontrados para o conteúdo tecidual da proteína estudada foram sempre expressos em porcentagem das proteínas por campo analisado. O valor final adotado para os subgrupos controle e experimento (irrigados com SF ou extrato oleoso de curcumina nas concentrações de 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia) foi sempre representado pelo valor médio, com o respectivo erro padrão. Todas as imagens selecionadas foram arquivadas para posterior documentação fotográfica.

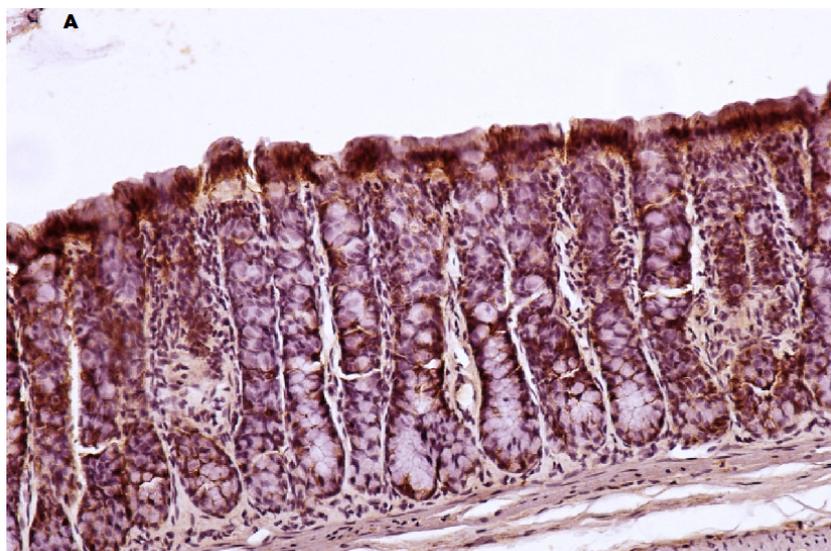


Figura 15 - Expressão da proteína E-caderina em segmento cólico deprovido de trânsito de animal submetido à intervenção com SF 0,9% por 4 semanas (200x).

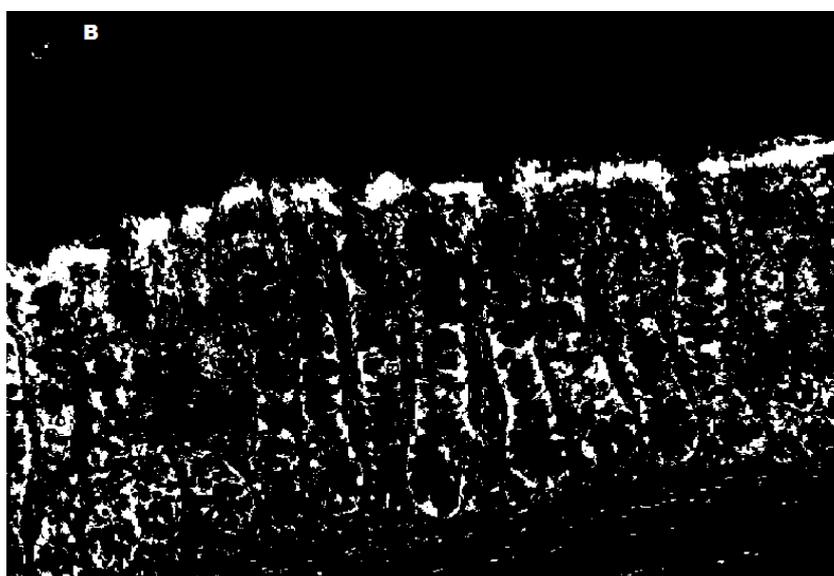


Figura 16 - Imagem binária utilizada para quantificação da expressão tecidual da proteína E-caderina (coloração branca) por análise de imagem assistida por computador no mesmo campo histológico acima descrito (HE 200 x).

4.9 Análises Estatísticas

Utilizou-se a planilha eletrônica MS-Excel, em sua versão do MS-Office 2013, para organização dos dados analisados. Para análise desses dados utilizou-se o pacote estatístico Biostat, em sua versão 5.4. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$). Quando o valor de p foi menor que 5% ($p < 0,05$) o resultado significativo foi identificado com um asterisco (*) ou uma cruz (†). Quando o valor de p foi menor que 1% ($p < 0,01$) o resultado significativo foi identificado com dois asteriscos (**) ou duas cruzeiras (††). O símbolo asterisco (*) foi utilizado sempre que se comparou o grupo de animais submetidos à intervenção com extrato oleoso de curcumina em ambas as concentrações (50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia) com os animais do grupo controle. O símbolo cruz (†) foi adotado quando se comparou animais irrigados com extrato oleoso de curcumina na concentração de 50 mg/kg/dia com aqueles irrigados com extrato oleoso de curcumina na concentração de 200 mg/kg/dia.

Os valores encontrados para o escore inflamatório e conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina, β -catenina e MPO, nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%, curcumina 50 mg/kg/dia e curcumina 200 mg/kg/dia, após duas e quatro semanas de intervenção, foram obtidos por estatística descritiva. Lembrando que foram realizadas três leituras em cada animal. Como cada um dos subgrupos experimentais era formado por seis animais ($n=6$), realizou-se 18 leituras para cada proteína, nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%, extrato oleoso de curcumina na concentração de 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg, por dia por duas e quatro semanas. Esses resultados foram transferidos para cada uma das colunas da planilha de Excel, que identificava em seu cabeçalho, a variável analisada (escore inflamatório, conteúdo tecidual de claudina-3, ocludina, E-caderina, β -catenina e MPO) em cada tempo de intervenção (duas e quatro semanas). Os resultados obtidos após análise dos dados de cada coluna foram sempre expressos pela média e respectivo erro padrão. Esse resultado final pode ser visto no ANEXO 2.

O valor médio final para o escore inflamatório foi expresso em cruzeiras (0 a 6 cruzeiras), enquanto o valor médio do conteúdo tecidual de cada proteína estudada foi expressa em porcentagem por campo histológico (%/campo).

Para se comparar o escore inflamatório se separou, inicialmente, os animais em dois grupos experimentais, segundo o tempo de intervenção: duas semanas e quatro semanas. Cada um desses dois grupos, por sua vez, foi dividido em três subgrupos ($n=6$) segundo

terem recebido intervenção com SF 0,9%, curcumina (50 mg/kg/dia) e curcumina (200 mg/kg/dia). Inicialmente compararam-se, de forma pareada, os resultados do escore inflamatório encontrado cada subgrupo, SF 0,9% × curcumina 50 mg/kg/dia; SF 0,9% × curcumina 200 mg/kg/dia; curcumina 50 mg/kg/dia × curcumina 200 mg/kg/dia, após duas semanas de intervenção. Posteriormente, compararam-se também de forma pareada, os resultados dos animais submetidos à intervenção com SF 0,9% × curcumina 50 mg/kg/dia; SF 0,9% × curcumina 200 mg/kg/dia; curcumina 50 mg/kg/dia × curcumina 200 mg/kg/dia por quatro semanas de intervenção. Para a comparação pareada de duas amostras pequenas e independentes optou-se pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Com o objetivo de verificar se os valores encontrados para o conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina, β -catenina e MPO, em cada subgrupo experimental (SF 0,9%, curcumina 50 mg/kg/dia e curcumina 200 mg/kg/dia), após duas e quatro semanas de intervenção, apresentavam distribuição normal, utilizou-se o teste de normalidade proposto por Kolmogorov-Smirnov. Constatou-se que os valores encontrados em todos os subgrupos experimentais, para todas as proteínas, em ambos os tempos de intervenção considerados, apresentavam distribuição normal. Como havia distribuição normal, utilizou-se o teste t de Student para comparar, dois a dois, os resultados encontrados após intervenção com SF 0,9% × curcumina 50mg/kg/dia; SF 0,9% × curcumina 200 mg/kg/dia; curcumina 50 mg/kg/dia × curcumina 200 mg/kg/dia por duas semanas. A seguir, obedecendo à mesma metodologia compararam-se os valores encontrados após intervenção por quatro semanas de intervenção.

Com objetivo de verificar se existia variação no conteúdo das proteínas analisadas segundo o tempo de intervenção (duas ou quatro semanas), utilizou-se o teste ANOVA com pós-teste de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 Escore inflamatório

A Fig. 17A representa a mucosa cólica desprovida de trânsito fecal submetida à intervenção com SF 0,9% por quatro semanas, enquanto a Fig.17B a mucosa irrigada também por 4 semanas. Foi possível verificar que no cólon irrigado com SF 0,9% existia perda epitelial com formação de ulcerações superficiais e infiltrado inflamatório na lâmina própria, enquanto nos animais submetidos à intervenção com curcumina 200 mg/kg/dia a superfície epitelial manteve sua integridade, sem formações de úlceras e menor infiltrado inflamatório.

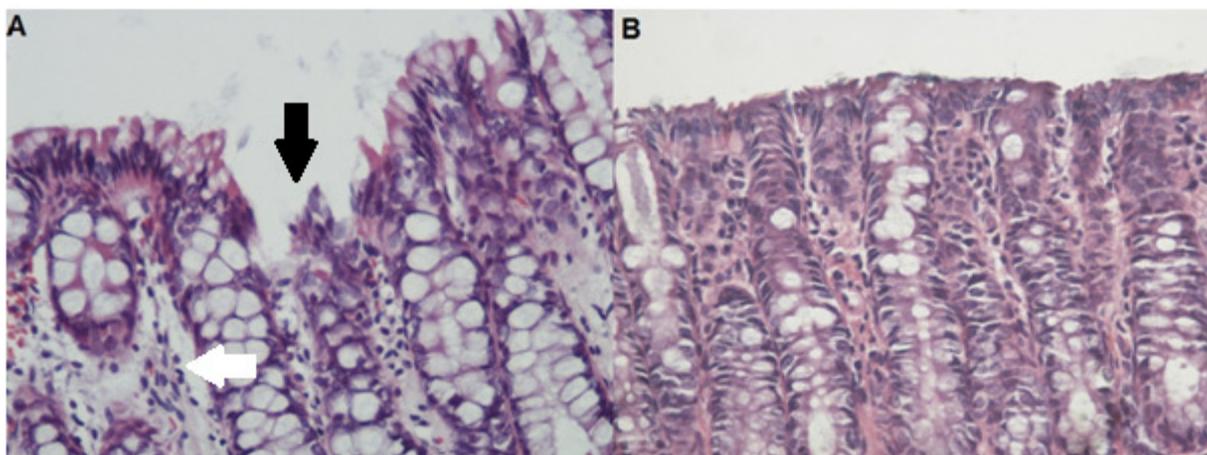


Figura 17 - A: Mucosa cólica em segmento desprovido de trânsito fecal submetido à intervenção com S.F. 0,9% por quatro semanas. Notar a formação de úlcera epitelial (seta preta), infiltrado inflamatório entre as glândulas cólicas (seta branca) e dilatação do citoplasma das células caliciformes (HE-400x). **B:** Mucosa cólica em segmento desprovido de trânsito fecal submetido à intervenção com curcumina na concentração de 200 mg/kg/dia por quatro semanas. O epitélio é regular, sem formação de úlceras na mucosa e com menor infiltrado inflamatório entre as glândulas (HE-200x).

Ao analisarmos o escore inflamatório na mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal, submetida à intervenção com SF 0,9%, curcumina 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por duas semanas encontramos, em média com respectivo desvio padrão, os valores de

4,4±1,2, 3,0±1,0 e 2,0±0,7. Esses resultados mostram que a intervenção com curcumina na dose de 200mg/kg/dia por duas semanas reduz significativamente o processo inflamatório na mucosa do cólon sem trânsito fecal ($p<0,01$). Quando mensurarmos o escore inflamatório na mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal, submetida à intervenção com SF 0,9%, curcumina 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por quatro semanas encontramos, em média com respectivo desvio padrão, os valores de 3,6±1,1, 3,0±0,9 e 1,3±0,5. Esses resultados mostram que a intervenção com curcumina na dose de 200 mg/kg/dia por quatro semanas reduz significativamente o escore inflamatório em relação aos animais submetidos a irrigação com SF 0,9% ($p<0,01$) e com curcumina na dose de 50 mg/kg/dia. Verificamos que houve melhora do escore inflamatório à medida que aumentou-se o tempo de intervenção apenas quando utilizamos a curcumina em maiores concentrações ($p<0,01$).

A Fig. 18 representa os resultados acima descritos.

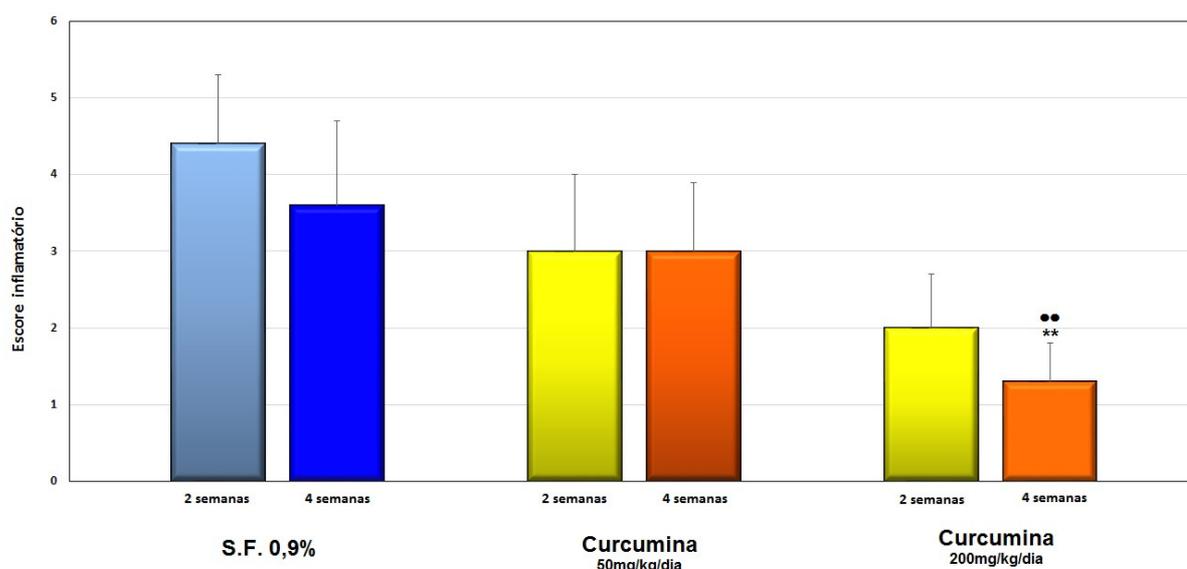


Figura 18 – Valores do escore inflamatórios em média com respectivo desvio padrão, dos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%, curcumina 50mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por duas e quatro semanas. $p<0,01$ (Curcumina 200mg/kg/dia × SF 0,9%). $p<0,01$ (Curcumina 200 mg/kg/dia × Curcumina 50 mg/kg/dia). Teste t de Mann-Withney.

5.2 Claudina-3

A Fig. 19A mostra a mucosa cólica desprovida de trânsito fecal submetida à intervenção com SF 0,9% por duas semanas, enquanto a Fig.19B a mucosa irrigada com curcumina 200 mg/kg/dia por 4 semanas. É possível verificar que no cólon irrigado com SF 0,9% existe menor expressão da proteína na superfície epitelial. A18B mostra a superfície epitelial dos animais submetidos à intervenção com curcumina 200 mg/kg/dia, onde verifica-se que o conteúdo de claudina-3 na superfície epitelial é nitidamente maior.

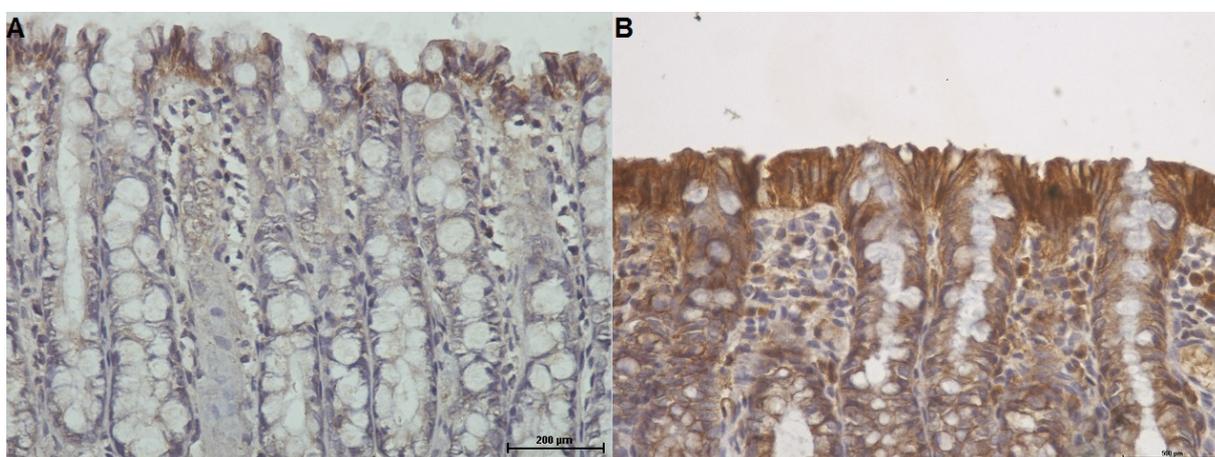


Figura 19 – A: Expressão da proteína claudina-3 em animais submetido à intervenção com SF 0,9% por 2 semanas. Existe menor expressão tecidual da proteína claudina-3 na superfície apical do epitélio cólico (IH-claudina-3 400×). **B:** Expressão intensa da proteína claudina-3 na superfície epitelial de animal submetido a intervenção com extrato oleoso de curcumina na dosagem de 200 mg/kg/dia por 4 semanas (IH-claudina-3 400×).

Ao mensurarmos o conteúdo tecidual da proteína claudina-3 nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal, submetida à intervenção com SF 0,9%, curcumina 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por duas semanas encontramos, em média com o respectivo erro padrão, os valores de $8,39 \pm 0,07$, $14,35 \pm 0,89$ e $19,69 \pm 0,83$. Esses resultados mostram que a intervenção com curcumina por duas semanas aumenta significativamente o conteúdo de claudina-3 nas glândulas cólicas, independente da concentração utilizada ($p < 0,01$). Após duas semanas de intervenção o conteúdo de claudina-3 era maior quando utilizamos concentração de 200mg/kg/dia quando comparado com a utilização de concentração de 50 mg/kg/dia ($p < 0,05$). Quando mensurarmos o conteúdo tecidual da

proteína claudina-3 nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal, submetida a intervenção com SF 0,9%, curcumina 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por quatro semanas encontramos, em média com o respectivo erro padrão, os valores de $7,55 \pm 0,89$, $16,95 \pm 1,26$ e $20,94 \pm 0,94$. Esses resultados mostram que a intervenção com curcumina por quatro semanas aumenta significativamente o conteúdo da proteína, independente da concentração utilizada ($p < 0,01$). Após quatro semanas de intervenção o conteúdo de claudina-3 era maior quando utilizamos concentração de 200mg/kg/dia comparada a concentração de 50 mg/kg/dia ($p < 0,01$).

Verificamos que houve aumento no conteúdo glandular de claudina-3 com relação ao tempo de intervenção apenas quando utilizamos a curcumina em maiores concentrações ($p < 0,01$).

A Fig. 20 resume os resultados acima descritos.

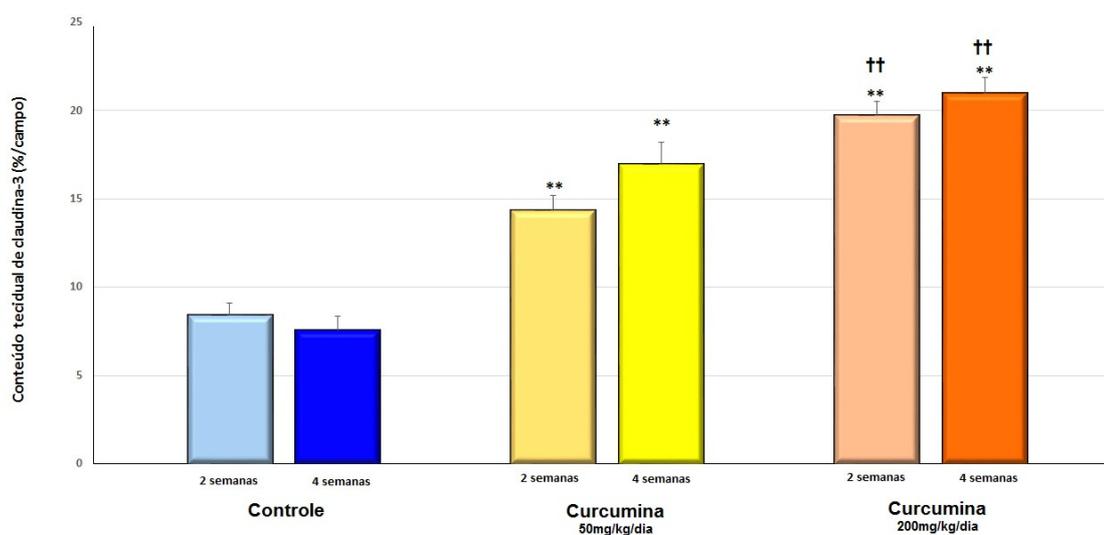


Figura 20 – Conteúdo da proteína claudina-3 nas glândulas da mucosa exclusiva de trânsito intestinal submetida a intervenção com SF 0,9%, curcumina (50 mg/Kg/dia) e curcumina (200mg/kg/dia) por duas e quatro semanas. ** = significativo com $p < 0,01$ (Curcumina 50 mg/kg/dia > SF0,9% e Curcumina 200 mg/kg/dia > SF 0,9%); †† = significativo com $p < 0,01$ (Curcumina 200 mg/kg/dia > Curcumina 50 mg/kg/dia). Teste de t de Student.

5.3 Ocludina

A Fig. 21A mostra a expressão tecidual de ocludina na mucosa cólica desprovida de trânsito fecal submetida à intervenção com SF 0,9% por duas semanas, enquanto a Fig. 20B a mucosa irrigada com extrato oleoso de curcumina na dose de 200/mg/kg/dia por 4 semanas. Foi possível verificar que no cólon irrigado com SF 0,9% existe menor expressão da proteína ocludina na superfície apical das glândulas da mucosa cólica, enquanto nos animais submetidos à intervenção com curcumina 200 mg/kg/dia o conteúdo de ocludina na superfície glandular epitelial é nitidamente maior.

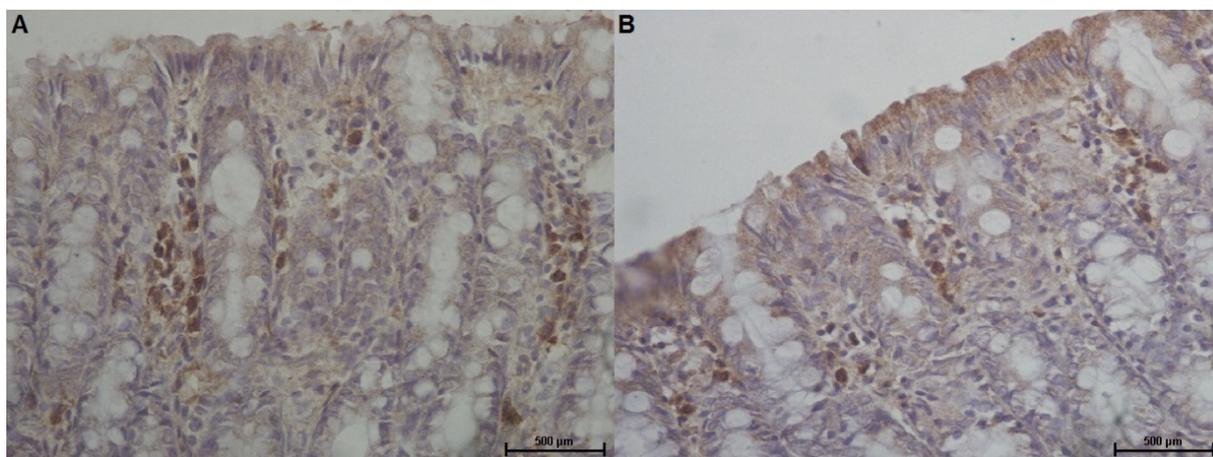


Figura 21 – **A:** Pequena expressão da proteína ocludina na superfície epitelial de animal submetido à intervenção com SF por 2 semanas (IH- ocludina 400×). **B:** Maior expressão da proteína ocludina na superfície epitelial de animal submetido à intervenção com extrato oleoso de curcumina (200 mg/kg/dia) por 4 semanas (IH-occludina 400×).

Ao mensurarmos o conteúdo tecidual da proteína ocludina nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal, submetida à intervenção com SF 0,9%, curcumina 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por duas semanas encontramos, em média com o respectivo erro padrão, os valores de $9,73 \pm 1,02$, $13,57 \pm 0,69$ e $15,45 \pm 0,46$. Esses resultados mostram que a intervenção com curcumina por duas semanas aumenta significativamente o conteúdo de ocludina nas glândulas cólicas, independente da concentração utilizada ($p < 0,01$). Após duas semanas de intervenção o conteúdo de ocludina era maior quando utilizamos concentração de 200mg/kg/dia quando comparado com a utilização de concentração de 50 mg/kg/dia ($p < 0,05$). Quando mensurarmos o conteúdo tecidual da proteína ocludina nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal, submetida à intervenção com SF 0,9%,

curcumina 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por quatro semanas encontramos, em média com o respectivo erro padrão, os valores de $11,14 \pm 0,45$, $13,95 \pm 0,63$ e $17,59 \pm 0,53$. Esses resultados mostram que a intervenção com curcumina por quatro semanas aumenta significativamente o conteúdo da proteína, independente da concentração utilizada ($p < 0,01$). Após quatro semanas de intervenção o conteúdo de ocludina era maior quando utilizamos concentração de 200mg/kg/dia comparada a concentração de 50 mg/kg/dia ($p < 0,05$).

Verificamos que houve aumento no conteúdo glandular de ocludina com relação ao tempo de intervenção apenas quando utilizamos a curcumina em maiores concentrações ($p < 0,04$).

A Fig. 22 resume os resultados acima descritos.

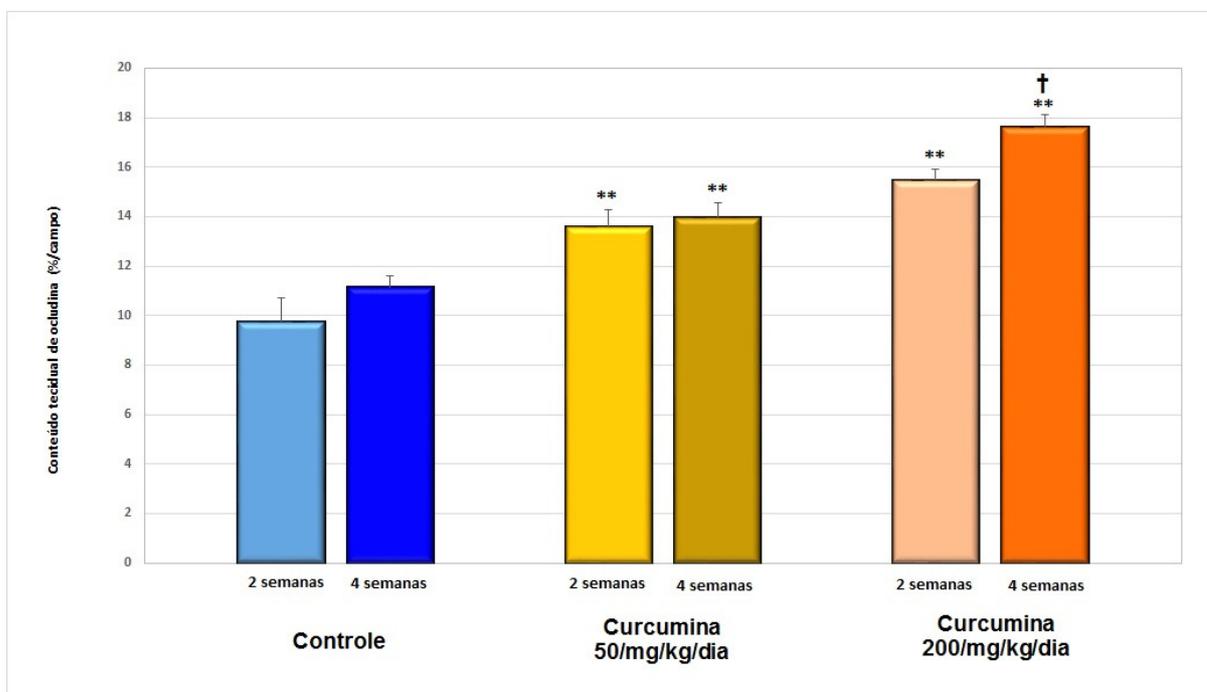


Figura 22- Conteúdo tecidual de ocludina nos segmentos sem trânsito intestinal após 2 e 4 semanas de intervenção com soro fisiológico 0,9% (controle), ou extrato oleoso de *Curcuma longa*. ** = significante: *Curcuma longa* 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia > SF, após duas e quatro semanas de intervenção ($p < 0,01$). † = significante: 200mg/kg/dia > 50mg/kg/dia ($p < 0,05$). Teste t de Student.

5.4 E-caderina

A Fig. 23A mostra a mucosa cólica desprovida de trânsito fecal submetida à intervenção com SF 0,9% e 23B a curcumina 200 mg/kg/dia por quatro semanas. É possível verificar que no cólon irrigado com SF 0,9% existe menor expressão da proteína E-caderina na superfície apical das glândulas da mucosa cólica, enquanto nos animais submetidos à intervenção com curcumina 200 mg/kg/dia o conteúdo de E-caderina na superfície glandular epitelial é nitidamente maior.

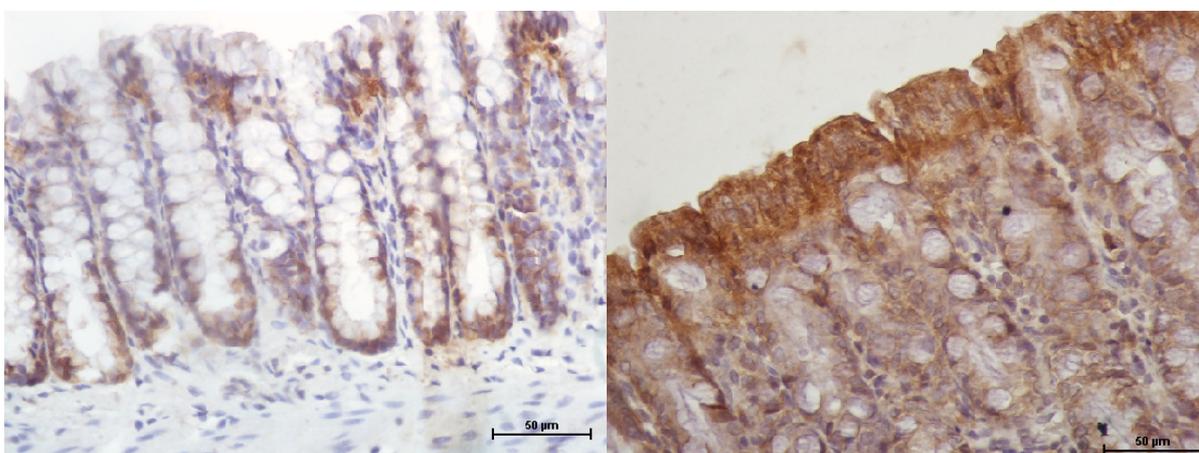


Figura 23 – A: Pequena expressão tecidual da proteína E-caderina na região apical das glândulas da mucosa cólica submetidas à intervenção com SF 0,9% por quatro semanas (IH-E-caderina 200×). **B:** Intensa expressão tecidual da proteína E-caderina nas glândulas da mucosa cólica de animal submetido à intervenção com extrato oleoso de curcumina na concentração de 200 mg/kg/dia por quatro semanas (IH-E-caderina 400×).

Ao mensurarmos o conteúdo tecidual da proteína E-caderina nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal, submetida à intervenção com SF 0,9%, curcumina 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por duas semanas encontramos, em média com o respectivo erro padrão, os valores de $2,78 \pm 1,36$, $21,19 \pm 1,03$ e $23,24 \pm 0,84$. Esses resultados mostram que a intervenção com curcumina por duas semanas aumenta significativamente o conteúdo de E-caderina nas glândulas cólicas, independente da concentração utilizada ($p < 0,01$). Após duas semanas de intervenção o conteúdo de E-caderina era maior quando utilizamos concentração de 200mg/kg/dia quando comparado com a utilização de concentração de 50 mg/kg/dia ($p < 0,05$). Quando mensurarmos o conteúdo tecidual da

proteína E-caderina nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal, submetida à intervenção com SF 0,9%, curcumina 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por quatro semanas encontramos, em média com o respectivo erro padrão, os valores de $3,58 \pm 0,22$, $20,99 \pm 0,77$ e $24,25 \pm 0,55$. Esses resultados mostram que a intervenção com curcumina por quatro semanas aumenta significativamente o conteúdo da proteína, independente da concentração utilizada ($p < 0,01$). Após quatro semanas de intervenção o conteúdo de E-caderina era maior quando utilizamos concentração de 200mg/kg/dia comparada a concentração de 50 mg/kg/dia ($p < 0,05$).

A Fig. 24 resume os resultados acima descritos.

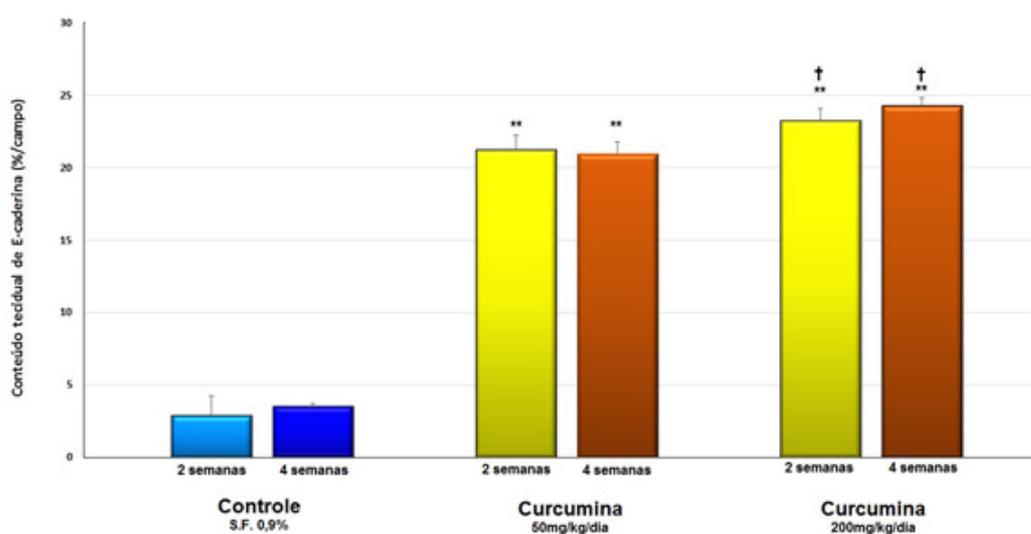


Figura 24– Conteúdo da proteína E-caderina nas glândulas da mucosa excusa de trânsito intestinal submetida a intervenção com SF 0,9%, curcumina (50 mg/Kg/dia) e curcumina (200mg/kg/dia) por duas e quatro semanas. ** = significativa com $p < 0,01$ (Curcumina 50 mg/kg/dia > SF0,9% e Curcumina 200 mg/kg/dia > SF 0,9%) ; • = significativa com $p < 0,05$ (Curcumina 200 mg/kg/dia > Curcumina 50 mg/kg/dia após 2 ou 4 semanas). Teste t de Student.

5.5 β -catenina

A Fig. 25A mostra a mucosa cólica desprovida de trânsito fecal submetida à intervenção com SF 0,9% e Curcumina 200 mg/kg/dia por duas semanas, enquanto a Fig. 25B a mucosa irrigada por 4 semanas. É possível verificar que no cólon irrigado com SF 0,9% existe menor expressão da proteína β -catenina na superfície apical das glândulas da mucosa cólica, enquanto nos animais submetidos à intervenção com curcumina 200 mg/kg/dia o conteúdo de β -catenina na superfície glandular epitelial é nitidamente maior.

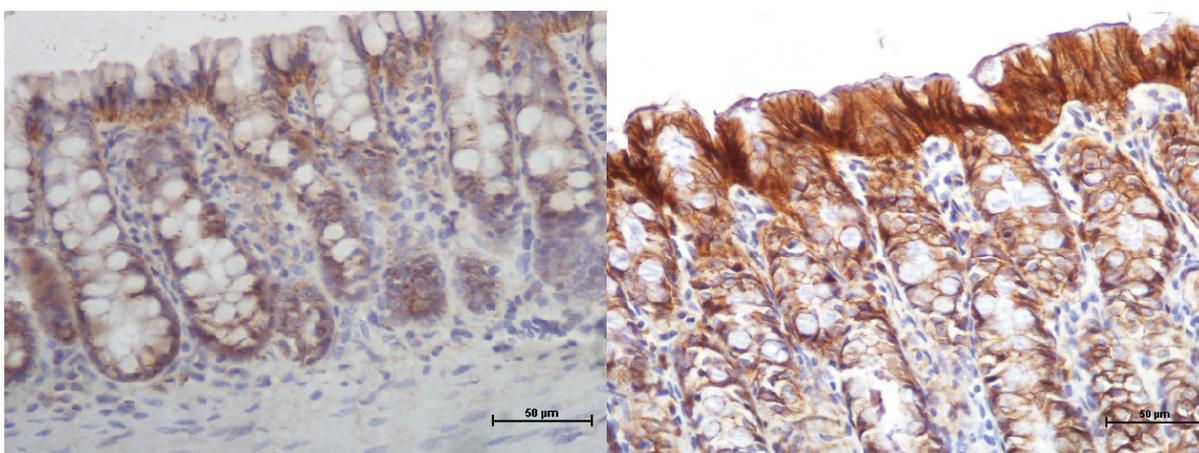


Figura 25- A: Pouca expressão tecidual da proteína β -catenina na superfície epitelial das glândulas da mucosa cólica de animal submetido à intervenção com SF 0,9% por quatro semanas (IH- β -catenina 200 \times). **B:** Expressão tecidual intensa da proteína β -catenina na região apical das glândulas da mucosa cólica submetidas à intervenção com extrato oleoso de curcumina na concentração de 200 mg/kg/dia por quatro semanas (IH- β -catenina 400 \times).

Ao mensurarmos o conteúdo tecidual da proteína β -catenina nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal, submetida à intervenção com SF 0,9%, curcumina 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por duas semanas encontramos, em média com o respectivo erro padrão, os valores de $4,20 \pm 1,30$, $20,14 \pm 0,99$ e $20,99 \pm 0,84$. Esses resultados mostram que a intervenção com curcumina por duas semanas aumenta significativamente o conteúdo de β -catenina nas glândulas cólicas, independente da concentração utilizada ($p < 0,01$). Após duas semanas de intervenção o conteúdo de β -catenina era maior quando utilizamos concentração de 200mg/kg/dia quando comparado com a utilização de concentração de 50 mg/kg/dia, todavia sem significância estatística. Quando mensurarmos o

conteúdo tecidual da proteína β -catenina nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal, submetida à intervenção com SF 0,9%, curcumina 50 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia por quatro semanas encontramos, em média com o respectivo erro padrão, os valores de $5,55 \pm 0,26$, $23,24 \pm 0,67$ e $24,85 \pm 0,75$. Esses resultados quando comparados aos encontrados nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9% mostram que a intervenção com curcumina por quatro semanas aumenta significativamente o conteúdo da proteína, independente da concentração utilizada ($p < 0,01$). Após quatro semanas de intervenção o conteúdo de β -catenina era maior quando utilizamos maior concentração ($p < 0,05$).

A Fig. 26 resume os resultados acima descritos.

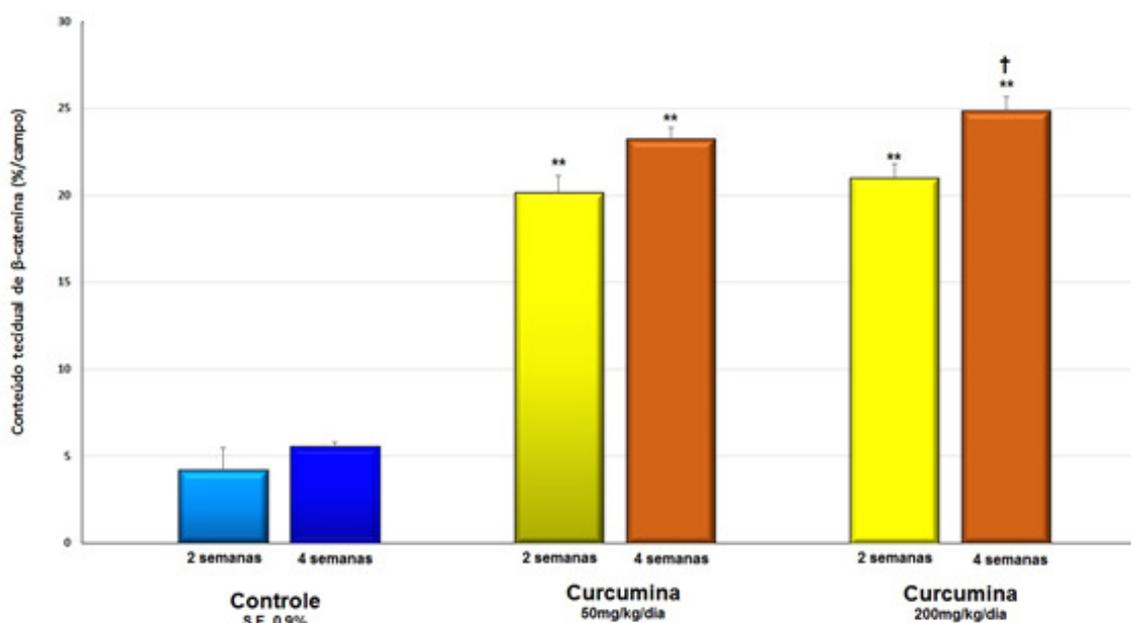


Figura 26 – Conteúdo da proteína β -catenina nas glândulas da mucosa excluída de trânsito intestinal submetida à intervenção com SF 0,9%, curcumina (50 mg/Kg/dia) e curcumina (200mg/kg/dia) por duas e quatro semanas. ** = significativo com $p < 0,01$ (Curcumina 50 mg/kg/dia > SF0,9% e Curcumina 200 mg/kg/dia > SF 0,9%); † = significativo com $p < 0,05$ (Curcumina 200 mg/kg/dia > Curcumina 50 mg/kg/dia após quatro semanas). Teste t de Student.

5.6 MPO

A Fig. 27A mostra a mucosa cólica desprovida de trânsito fecal submetida à intervenção com SF 0,9% por quatro semanas, enquanto a Fig. 27B a mucosa irrigada com Curcumina 200 mg/kg/dia por 4 semanas. É possível verificar que no cólon irrigado com SF 0,9% existe maior expressão tecidual da proteína MPO, enquanto nos animais submetidos à intervenção com curcumina 200 mg/kg/dia o conteúdo de MPO é menor.

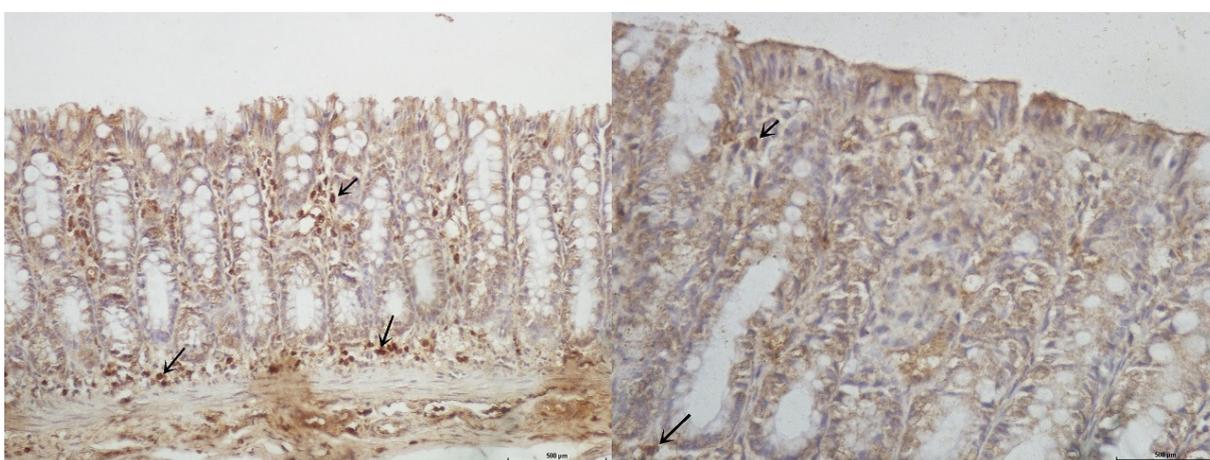


Figura 27- A: Expressão tecidual da enzima MPO em neutrófilos existentes no estroma e lamina basal das glândulas da mucosa cólica submetidas a intervenção com SF 0,9% por quatro semanas (setas pretas) (IH-E-caderina 200×). **B:** Expressão tecidual da enzima MPO nos neutrófilos no estroma das glândulas da mucosa cólica submetidas a intervenção com extrato oleoso de curcumina na concentração de 200 mg/kg/dia por quatro semanas (setas pretas) (IH-E-caderina 400×).

Verificou-se que o conteúdo de MPO nos animais irrigados com SF 0,9%, Curcumina na dosagem de 50 mg/kg/dia e Curcumina 200 mg/kg/dia após 2 semanas de irrigação foi de $21,81 \pm 4,24$, $4,13 \pm 1,90$ e $1,01 \pm 0,66$, respectivamente. O conteúdo de MPO nos animais irrigados com SF 0,9%, Curcumina na dosagem de 50 mg/kg/dia e Curcumina 200 mg/kg/dia após 4 semanas de irrigação foi de $21,91 \pm 3,41$, $2,25 \pm 1,37$ e $0,85 \pm 0,40$, respectivamente. Verificou-se que os animais submetidos à intervenção com curcumina apresentavam diminuição significativa no infiltrado neutrofílico avaliado pelo conteúdo tecidual de MPO, principalmente com o uso de maiores concentrações da substância por tempo mais prolongado ($p < 0,01$).

A Fig. 28 mostra os resultados acima descritos.

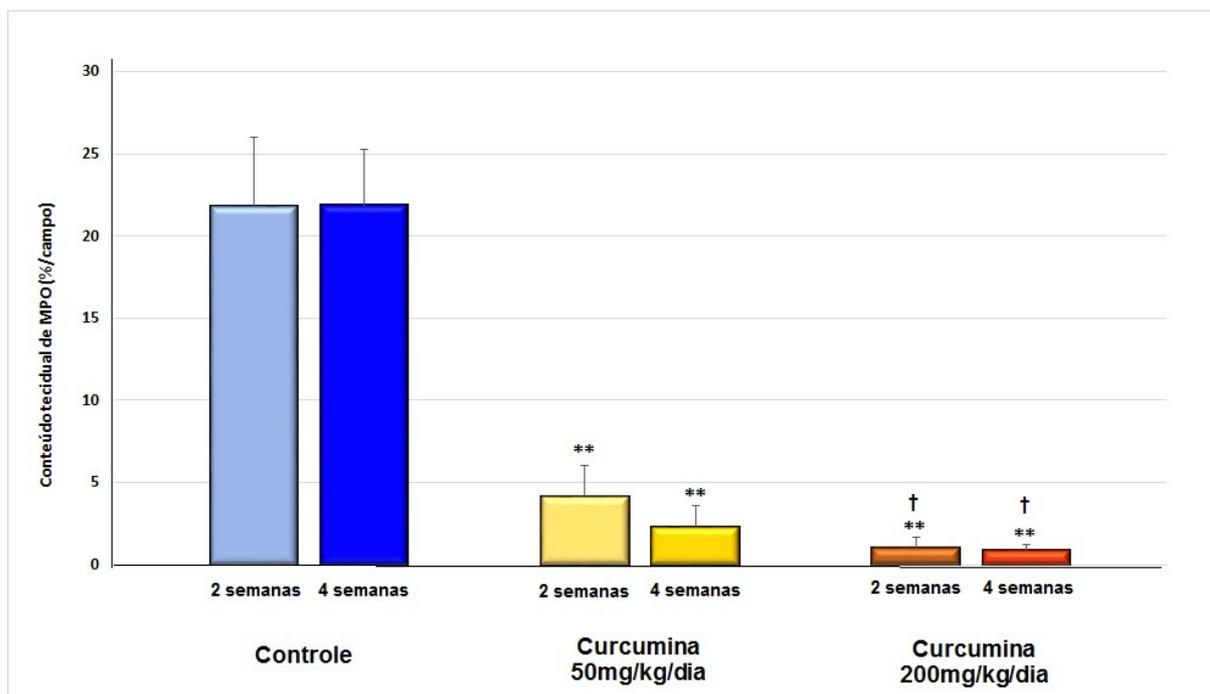


Figura 28 – Conteúdo da enzima MPO no estroma das glândulas da mucosa exclusiva de trânsito intestinal submetida a intervenção com SF 0,9%, curcumina (50 mg/Kg/dia) e curcumina (200mg/kg/dia) por duas e quatro semanas. ** = significativo com $p < 0,01$ (Curcumina 50 mg/kg/dia < SF0,9% e Curcumina 200 mg/kg/dia < SF 0,9%); † = significativo com $p < 0,05$ (Curcumina 200 mg/kg/dia < Curcumina 50 mg/kg/dia após quatro semanas). Teste t de Student.

5.7 Variação no conteúdo das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina, β -catenina e MPO em relação ao tempo de intervenção (duas ou quatro semanas)

A Tabela 1 representa a variação no conteúdo tecidual de cada uma das proteínas estudadas segundo o tempo de intervenção. Considerando a concentração utilizada verificamos que houve aumento no conteúdo glandular de E-caderina com relação ao tempo de intervenção apenas quando se utilizou a curcumina em maiores concentrações ($p=0,04$). Da mesma forma encontrou-se aumento no conteúdo glandular de β -catenina com relação ao tempo de intervenção independente da concentração utilizada ($p=0,03$). Houve redução

no infiltrado neutrofílico (níveis teciduais de MPO) com a intervenção por maior período de tempo.

Tabela 1 – Variação no conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, e-caderina, β -catenina e MPO na mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal submetida à curcumina (50mg/kg/dia) e 200mg/kg/dia após duas e quatro semanas.

	2 semanas		4 semanas	
	M \pm EP		M \pm EP	
	Cur 50mg	Cur 200mg	Cur 50mg	Cur 200mg
Claudina-3	14,35 \pm 0,89	19,69 \pm 0,83	16,95 \pm 1,26	20,94 \pm 0,94
Ocludina	21,19 \pm 1,03	23,24 \pm 0,84	20,99 \pm 0,77	24,25 \pm 0,55
E-caderina	21,19 \pm 1,03	23,24 \pm 0,84	20,99 \pm 0,77	24,25 \pm 0,55*
B-catenina	20,14 \pm 0,99	20,99 \pm 0,84	23,24 \pm 0,67*	24,85 \pm 0,75*
MPO	4,13 \pm 1,90	2,25 \pm 1,37	1,01 \pm 0,66*	0,85 \pm 0,40*

M = Média; EP = Erro padrão; Cur = Curcumina; mg= miligramas; MPO= mieloperoxidase.
Teste ANOVA

6 DISCUSSÃO

A utilização de extratos obtidos a partir das plantas vem sendo empregada há milênios com diferentes propósitos. Até os nossos dias, a utilização de extratos vegetais ainda possuiu papel importante nos cuidados com a saúde de diferentes etnias (NEWMAN; CRAGG, 2007). A medicina exercida a partir do uso dessas substâncias em muitos países representa a única alternativa disponível para o tratamento das doenças. A importância desse tipo de medicina pode ser dimensionada quando se constata que de um total aproximado de 877 drogas introduzidas na prática médica mundial entre 1981 e 2002, 61% delas foram obtidas a partir de extratos vegetais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2007). Na Índia a medicina Ayurvédica ainda hoje utiliza extratos vegetais para o tratamento de diferentes enfermidades inflamatórias, degenerativas e, até mesmo o câncer (RAHMANI et al., 2014; BOYANAPALLI; TONY KONG, 2015). Estudo mostrou que cerca de 80% dos habitantes de países subdesenvolvidos dependem primariamente de extratos naturais para atender suas necessidades médicas (MUKHERJEE; WAHILE, 2006). Pesquisas realizadas em países desenvolvidos como os Estados Unidos da América sugerem que um em cada três norte-americanos utiliza produtos naturais diariamente e, possivelmente, um em cada dois doentes com câncer (mais de 50% dos doentes tratados por câncer), também faz uso de medicamentos obtidos de produtos naturais (GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008). No Brasil, país em desenvolvimento, de dimensões continentais, com uma perversa distribuição de renda e que possui grande parte de sua população sem acesso aos avanços da medicina moderna, provavelmente esse número deve ser ainda mais expressivo (ALMEIDA, 2006). Merece destaque o fato de que nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, o tratamento com substâncias extraídas a partir das plantas da nossa flora é uma tradição importante da cultura popular.

Nas últimas duas décadas a melhor compreensão dos mecanismos moleculares de ação de muitos desses produtos naturais aumentou, consideravelmente, o interesse da medicina contemporânea no potencial uso dessas substâncias para o tratamento de diferentes enfermidades e, em particular, das DII (GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008). Dentre os extratos naturais que vem despertando interesse crescente na medicina moderna, a curcumina, principal componente extraído do rizoma da *Curcuma longa*, apresenta cada vez mais lugar de destaque na literatura mundial (ALMEIDA, 2006). Apesar do extrato de *Curcuma longa* vir sendo utilizado na Índia, China e Sudeste da Ásia há vários

séculos, com diferentes propósitos, somente nas três últimas décadas, com o melhor conhecimento de seus mecanismos moleculares de ação, despertou interesse dos países ocidentais.

A curcumina foi isolada sob a forma de cristais em 1815, porém a estrutura molecular de seu princípio ativo, o diferuloilmetano, só foi decifrada e sintetizada quase um século depois em 1910 (*apud* LAMPE; MILOBEDZKA, 1913). Das diferentes substâncias extraídas do rizoma da *Curcuma longa*, a curcumina representa seu principal princípio ativo. Da raiz da planta, ainda são extraídas outras substâncias, tais como a dimetoxicurcumina, bisdimetoxicurcumina e ciclocurcumina. A curcumina constitui 77% do extrato obtido, enquanto a dimetoxicurcumina, bisdimetoxicurcumina e a ciclocurcumina 17% e 3% e menos de 1%, respectivamente (ALMEIDA, 2006).

A curcumina tem fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$, peso molecular de 368,37 g/mol. Apresenta coloração amarelada em pH situado entre 2.5-7.0 e, avermelhada, em pH maior que 7.0. Depois de extraída do rizoma da *Curcuma longa*, a curcumina tem a forma de um pó amarelo-alaranjado, insolúvel na água, mas solúvel no etanol, acetona e glicerol (ALMEIDA, 2006). A insolubilidade em água se constituiu numa das maiores dificuldades em se conseguir elevar os níveis séricos de curcumina após sua administração por via oral. A insolubilidade na água dificulta a absorção pelo trato digestivo, fazendo com que níveis séricos terapêuticos só possam ser atingidos, após administração de quantidade significativa da substância. Apesar disso, a substância atinge altas concentrações na luz intestinal quando administrada por via oral. Esse fato sugere que a ação tópica da substância possa ser mais importante que sua ação sistêmica. Com a evolução da indústria farmacêutica e o advento da nanotecnologia hoje é possível obter a curcumina solúvel em água (GUZMAN-VILLANUEVA et al., 2013).

Tradicionalmente, a curcumina vem sendo utilizada como uma especiaria alimentícia pelo seu sabor peculiar, como corante na indústria de cosméticos pela sua intensa coloração amarela e, mais recentemente, como medicamento (GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008). A curcumina vem sendo utilizada para o tratamento de doenças respiratórias (tosse crônica, sinusite, bronquite, asma e alergias), hepáticas (esteatose e fibrose hepática), reumáticas (artrite, osteoartrite e artroses), úlceras cutâneas, diabetes e nas queimaduras (ARAÚJO; LEON, 2001). Na medicina chinesa a curcumina é utilizada como antiespasmódico e antiflatulento (AGGARWAL; TAKADA; OOMMEN, 2004). No passado a substância também foi prescrita para o tratamento de entorses e inchaços articulares (ARAÚJO; LEON, 2001). Como existe maior biodisponibilidade da forma enólica, a curcumina possui importante atividade sequestradora de RLO tornando-se um potente

agente antioxidante. Estudos mostraram que não apenas a curcumina, mas a dimetoxicurcumina e a bisdimetoxicurcumina, também apresentam ação antioxidante (JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2006). Portanto, potente ação antioxidante do extrato oleoso obtido do rizoma se deve à somatória dos efeitos de seus três principais constituintes (JAYAPRAKASHA et al., 2002; JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2006). A potente atividade antioxidante da curcumina pode ser comparada às vitaminas C e E (TODA et al., 1988). É possível que a ação anticarcinogênica atribuída à curcumina esteja relacionada à sua ação antoxidante, evitando estresse oxidativo ao DNA das células (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003).

Em todo oriente já se conhecia o potente efeito anti-inflamatório da curcumina. Essa propriedade foi confirmada pelas modernas técnicas laboratoriais disponíveis atualmente (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003). Estudos recentes confirmaram tanto *in vitro* quanto *in vivo* que a curcumina possui atividade anti-inflamatória, possibilitando sua prescrição para o tratamento de afecções inflamatórias articulares e prevenção contra o desenvolvimento da artrite reumatóide (NONOSE, 2011; CHANDRAN; GOEL, 2012; NONOSE et al., 2014; CORADINI et al., 2015). A curcumina também apresenta efeitos antimicrobianos, antiarterioesclerose, hepatoprotetor, anticoagulante, antitrombótico e hipoglicemiante (KISO et al., 1983; BROUET; OHSHIMA, 1995; LIMTRAKUL et al, 1997; AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003; GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008; CHANDRAN; GOEL, 2012; KIM; KU; BAE, 2012; CHUENG SAMARN et al., 2014; HASAN et al., 2014; JEENGAR et al., 2014; NEERATI; DEVDE; GANGI, 2014; NONOSE et al, 2014). Recentemente, uma série ensaios clínicos e pesquisas experimentais confirmaram resultados promissores no tratamento de diferentes tipos de neoplasias (BYUN; KIM; KIM, 2015; DEGUCHI, 2015; DÍAZ OSTERMAN, et al., 2015; GHOSH; BANERJEE; SIL, 2015; ZHOU et al., 2015). Merece destaque o fato de que maioria desses estudos não demonstrou toxicidade com o uso da substância, mesmo quando utilizada em doses elevadas e em crianças (SUSKIND et al., 2013). Essa propriedade mostra que além de ser eficaz do ponto de vista terapêutico a utilização da curcumina cursa com efeitos colaterais desprezíveis sendo segura para o uso em seres humanos (SUSKIND et al., 2013; VECCHI BRUMATTI et al., 2014). Essa propriedade se mantém mesmo quando a substância é utilizada em conjunto com outras drogas. Goel et al., (2008) estudando os mecanismos de ação da curcumina mostraram que o extrato atua modulando diferentes mecanismos intercelulares. A tabela 3 resume os principais alvos moleculares descritos que podem sofrer interferência da curcumina.

Quadro 2- Principais alvos celulares para ação da curcumina

Fatores de transcrição	Quinases
β -catenina	Receptor de quinase extracelular
NF- κ B	Janus quinase
Notch 1	Quinases de adesão celular
Citocinas inflamatórias	Fatores de crescimento
IL-1	Tecido conjuntivo
IL-2	Epitelial
IL-5	Fibroblastos
IL-6	Tecidual
IL-8	VEGF
IL-12	TG
TNF- α	Plaquetas
Enzimas	Moléculas de adesão
COX-2	Intracelular
DNA plimerase	Endotelial de leucócitos
Glutationa-S-transferase	Vascular
Hemeoxigenase	Proteínas anti-apoptóticas
iNOS	BCL-2
LOX	Proteína -1 de inibição de apoptose
Radicais livres de Oxigênio	Outros
Efeito sequestrador (scavengers)	Ciclina D-1

Modificado de GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008

Uma série de estudos mostrou que o estresse oxidativo possui um papel importante em várias doenças como o infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, isquemias de reperfusão como ocorre nos fenômenos tromboembólicos, choque hemorrágico, hipóxia, DII e câncer (REDDY e LOKESH, 1994a; REDDY e LOKESH, 1994b; PRAVDA, 2005; GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008; GHOSH; BANERJEE; SIL, 2015). Os efeitos antioxidantes da curcumina foram exaustivamente estudados e mostraram atividade sinérgica quando associados a outras substâncias (SINGER; ADLER, 2015). A molécula da curcumina é capaz de sequestrar uma grande variedade de RLO, que incluem o anion superóxido, o radical hidroxil, assim como radicais livres de nitrogênio (REDDY; LOKESH, 1994; UNNIKRISHNAN; RAO, 1995; SREEJAYAN; RAO, 1996; SREEJAYAN; RAO, 1997). A curcumina apresenta ação antioxidante protegendo as células epiteliais contra a peroxidação lipídica de suas membranas, o que preserva a integridade celular em diferentes modelos experimentais (REDDY; LOKESH, 1994a). Nas últimas décadas, os efeitos da curcumina nas DII foram avaliados por vários estudos. Os resultados desses estudos mostraram que os efeitos antioxidantes da substância, sequestrando RLO, influenciam vias de sinalização celular, especialmente as vias das quinases, preservam as junções intercelulares e, com isso, a integridade da barreira epitelial (WANG et al., 2012). A curcumina reduz a atividade da MPO, COX-1, COX-2, LOX, TNF- α , iNOS, inibindo com isso a via do NF-kappaB relacionado a manutenção da integridade da barreira epitelial (MA et al., 2004; WANG et al, 2012). Camacho-Barquero et al., (2007) mostraram que a curcumina também age na via da MAPK modulando a expressão tecidual da COX-2 e, da forma induzida, da iNOS (CAMACHO-BARQUERO et al., 2007).

Dentre todos os mecanismos de ação conhecidos da curcumina, os efeitos antioxidante e anti-inflamatório tornaram interessante o uso da substância no tratamento de diferentes tipos de doenças inflamatórias. Quando se sabe que o estresse oxidativo tem um importante papel na etiopatogênese das DII à possibilidade de testar a eficácia da curcumina nessas enfermidades revela-se uma proposta interessante (UKIL et al., 2003; PRAVDA, 2005; YADAV et al., 2009; MARTINEZ et al, 2010b).

A retocolite ulcerativa e a doença de Crohn são as duas formas mais comuns de enfermidades inflamatórias que acometem o cólon. Apesar de não ser considerada no grupo das DII, a CE apresenta características clínicas, endoscópicas e histopatológicas semelhantes à retocolite ulcerativa. Até mesmo o papel desempenhado pelos RLO na iniciação e manutenção da agressão aos sistemas de defesa da barreira epitelial é semelhante (PRAVDA, 2005; MARTINEZ et al., 2010b). Nas DII de evolução crônica após a quebra da barreira de proteção epitelial existe um desbalanço entre a maior produção de

RLO e a capacidade dos sistemas antioxidantes presentes na mucosa intestinal em neutralizá-los, perpetuando o estresse oxidativo (BABBS, 1992; MCKENZIE et al., 1996; AW, 1999). Já se demonstrou anteriormente que o estresse oxidativo é capaz de destruir os principais mecanismos de defesa da barreira epitelial, em particular as junções de adesão intercelulares (WANG et al., 2012). Quando ocorre ruptura da barreira epitelial os neutrófilos são sinalizados e migram para o local com o objetivo de conter a infiltração bacteriana. A infiltração neutrofílica aumenta ainda mais, a produção de RLO que, agindo em sinergismo com a presença de peptídeos antibacterianos e enzimas oxidativas como a MPO contribuem dramaticamente para o aumento da lesão tecidual (GRISHAM; YAMADA, 1992; KUCHARZIK et al., 2001). Da mesma forma como ocorre nas DII, estudos mostraram que em modelos experimentais de CE, o estresse oxidativo também é o mecanismo molecular responsável pelo dano ao epitélio cólico (MARTINEZ et al, 2010b). Dessa forma, considerando as notáveis propriedades antioxidantes da curcumina e o papel que os RLO exercem na patogênese das DII e da CE, seria interessante avaliar seus efeitos em modelos experimentais e em portadores dessas enfermidades.

Uma série de estudos em modelos experimentais de colite que avaliaram a ação anti-inflamatória da curcumina, pela medida de diferentes citocinas e outros mediadores inflamatórios, mostraram que os efeitos da substância encontram-se relacionados à capacidade da curcumina em inibir a expressão tecidual de COX-1, COX-2, LOX, citocinas Th1 (IL-12, INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-27) e aumentar a produção de PGE-2 e citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) na mucosa cólica (ZHANG et al., 2006b; LARMONIER et al., 2008; LUBBAD et al., 2009a; BALIGA et al., 2012; ZENG et al., 2013). Da mesma forma, verificou-se que a curcumina é capaz de melhorar o processo inflamatório na mucosa cólica por inibir a expressão do INF- γ (MIDURA-KIELA, et al., 2012). Mais recentemente, demonstrou-se que a curcumina também reduz o processo inflamatório da mucosa cólica por diminuir a intensidade da apoptose celular na mucosa cólica por modular a via de sinalização da JNK e STAT3, recentemente descritas como vias de sinalização envolvidas na etiopatogenia das DII (TOPCU-TARLADACALISIR et al., 2013; LIU et al., 2013; YANG et al., 2013). A curcumina mostrou-se capaz de regular o equilíbrio na relação oxidantes/antioxidantes na mucosa cólica e modular a secreção de TNF- α e óxido nítrico (ARAFI et al., 2009; MOUZAOUI et al., 2012). É possível que os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da curcumina, também estejam relacionados à inibição da quimiotaxia tecidual de neutrófilos aos tecidos inflamados reduzindo dessa forma a produção de RLO (UKIL et al., 2003; LAMONIER et al., 2011).

Revisando a literatura verificamos que Sugimoto et al., (2002) foram os primeiros autores a utilizar a administração oral da curcumina num modelo de colite induzida por TNBS em camundongos. Utilizando a curcumina misturada na ração dos animais nas concentrações de 0,5%, 2% e 5% mostraram que a administração de curcumina por via oral previniu e melhorou as alterações histológicas induzidas pelo TNBS (SUGIMOTO et al., 2002). Os autores sugeriram que os efeitos da curcumina provavelmente estavam relacionados à inibição da ativação da via de sinalização do NF-kappaB (SUGIMOTO et al., 2002). Diante desses resultados sugeriram que a administração oral de curcumina poderia ser uma potencial estratégia terapêutica para o tratamento das DII (SUGIMOTO et al., 2002).

Esses mesmos resultados foram obtidos quanto se testou os efeitos da administração oral de curcumina num modelo de colite induzida pelo ácido dinitrobenzeno sulfônico (DNBS) (SALH et al., 2003). Outros estudos utilizando o mesmo modelo de colite induzida proposto por Sugimoto et al., (2002), confirmaram os efeitos benéficos da curcumina, na colite experimental, pois além da substância melhorar as alterações histológicas encontradas na mucosa cólica, diminuía o infiltrado inflamatório, avaliado pelos níveis teciduais de MPO (UKIL et al., 2003). Esse estudo mostrou que um dos efeitos mais impressionantes da curcumina relacionava-se à capacidade da substância em reduzir o estresse oxidativo tecidual, avaliado pelos níveis teciduais de malondialdeído, um importante marcador de lipoperoxidação de membranas celulares (UKIL et al., 2003). Os autores mostraram que animais tratados com curcumina apresentavam menores níveis teciduais de óxido nítrico (ON) e de RLO (UKIL et al., 2003). Os autores também confirmaram que os efeitos da curcumina estavam relacionados à inibição da transcrição do NF-kappaB (UKIL et al., 2003). Concluíram que a curcumina pode ser considerada uma substância útil como terapia adjuvante nos portadores de DII (UKIL et al., 2003). A capacidade da curcumina de inibir a via ativação da via do NF-kappaB foi confirmada posteriormente por outros estudos (JIAN et al., 2005; ZHANG et al., 2006b; DEGUCHI et al., 2007; VENKATARANGANNA et al., 2007).

Modelos experimentais de colite utilizando camundongos geneticamente modificados, deficientes na produção da citocina anti-inflamatória IL-10, confirmaram que a administração de curcumina emulsificada em metilcelulose, com o objetivo de determinar a liberação programada da droga no cólon, melhorava as alterações histológicas e reduzia a produção de outros subtipos de citocinas inflamatórias (UNG et al., 2010).

Uma revisão dos estudos que utilizaram a curcumina para o tratamento das DII em seres humanos mostrou que até 2011, existiam apenas dois estudos publicados (TAYLOR;

LEONARD, 2011). No primeiro deles os autores administraram a curcumina em cinco doentes com retocolite ulcerativa e cinco com doença de Crohn (HOLT; KATZ; KIRSHOFF, 2005). Verificaram que os doentes com retocolite ulcerativa apresentaram melhora clínica significativa. Dos portadores de doença de Crohn quatro apresentaram melhora dos sintomas com redução do número de evacuações, melhora da diarreia e das cólicas abdominais. No segundo, um estudo randomizado, os autores avaliaram os efeitos da administração da curcumina associada ao ácido 5-ASA no tratamento da DII. Mostraram que a curcumina foi capaz de manter por mais tempo a resposta clínica sustentada quando comparada a utilização isolada do ácido 5-ASA (HANAI et al., 2006). Em ambos os estudos, apesar dos efeitos promissores da substância, os autores recomendam que uma posição definitiva com relação ao uso da curcumina para o tratamento das DII só possa ser definido com estudos randomizados que envolvam maior número de doentes (HOLT et al., 2005; HANAI et al, 2006).

A primeira revisão sistemática da literatura avaliando a eficácia do emprego da curcumina na manutenção da resposta sustentada anti-inflamatória em doentes com colite ulcerativa foi publicada recentemente (KUMAR et al., 2013). Nesse estudo, os autores incluíram apenas um estudo randomizado que avaliou os efeitos da curcumina em 45 doentes comparando com um grupo de doentes que recebeu placebo. Cabe destacar que todos os doentes, de ambos os grupos, recebiam concomitantemente um derivado salicílico (sulfasalazina ou ácido 5-ASA). Essa metanálise mostrou que a curcumina utilizada concomitantemente com derivados aminosalicílicos foi eficaz na manutenção da resposta clínica sustentada com menores índices de recidiva do processo inflamatório (KUMAR et al., 2013). Recentemente, estudo randomizado duplo-cego e placebo controlado avaliou-se os efeitos da curcumina em 50 portadores de retocolite ulcerativa leve a moderada que não respondiam a dose máxima de ácido 5-ASA (LANG et al., 2015). Os doentes foram divididos em dois subgrupos equivalentes segundo receberem 3 g/dia de curcumina por via oral ou placebo por quatro semanas, concomitante com a manutenção do 5-ASA. Os autores verificaram que os doentes que receberam curcumina apresentaram melhora da resposta clínica e melhora da resposta inflamatória avaliada por colonoscopia. Concluíram que a curcumina em combinação com o 5-ASA é estratégia segura e eficaz para melhora da sintomatologia e da atividade inflamatória em portadores de formas moderadas de colite ulcerativa (LANG et al., 2015).

Apesar de a farmacocinética mostrar que a curcumina tem pouca solubilidade em água, o que torna problemática sua administração oral, a substância atinge grandes concentrações no lúmen intestinal, sugerindo que os efeitos tópicos da curcumina possam

apresentar melhor efeito terapêutico (SINGLA et al., 2014). Recentemente, avaliou-se a eficácia da aplicação de enemas contendo curcumina, em portadores de formas leves e moderadas de retocolite ulcerativa que comprometia, principalmente, o reto distal (SINGLA et al., 2014). O estudo avaliando 45 doentes mostrou que os doentes que receberam enemas com curcumina apresentaram grande melhora do processo inflamatório com redução dos escores de atividade da doença. Cabe destacar, que este foi o primeiro estudo que avaliou o uso da curcumina aplicada por via retal, mostrando que os efeitos tópicos da substância parecem ser maiores que os obtidos quando a droga é administrada por via oral (SINGLA et al., 2014). Essas evidências estimularam grupos a testar a ação da curcumina em cápsulas de liberação retardada, com o objetivo de fazer com que a liberação da substância ocorra apenas no intestino grosso doente (SAREEN et al., 2014; SAREEN et al., 2015).

Na última década demonstrou-se que estresse oxidativo é um dos prováveis mecanismos etiopatogênicos da CE (MARTINEZ, 2010b). Demonstrou-se que os diferentes mecanismos de defesa que formam a barreira epitelial da mucosa cólica encontram-se danificados pelos RLO em modelos experimentais de CE (NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010a; MARTINEZ et al., 2012; KADRI et al., 2013; MARTINEZ et al. 2015). Constatou-se que o conteúdo tecidual das proteínas existentes nas junções aderentes (E-caderina e β -catenina) e de oclusão (claudina-3 e ocludinas), que indiretamente refletem a integridade da barreira epitelial, sofre redução significativa à medida que os níveis de estresse oxidativo também aumentam (KADRI, 2010; MARTINEZ, 2010; FABRIS, 2011; MARTINEZ et al., 2012; CARVALHO, 2013; FERREIRA, 2013; KADRI et al., 2013; MARTINEZ et al., 2015). Já havia sido demonstrado que substâncias naturais ou sintéticas com atividade antioxidante melhoravam a inflamação mucosa no modelo experimental de CE (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO ET al., 2011; CUNHA ET al., 2011; MARTINEZ ET al., 2013; CHAIM, 2014; CHAIM ET al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA ET al., 2015). Quando se considera que a curcumina possui potente ação antioxidante, e que as junções intercelulares de oclusão e adesão encontram-se danificadas na CE devido ao estresse oxidativo, torna-se interessante avaliar a capacidade da curcumina em preservar o conteúdo tecidual das proteínas constituintes das junções de oclusão e adesão. Caso a curcumina preserve o conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina e β -catenina, indiretamente poderiam interferir que a substância fosse capaz de manter a integridade das junções intercelulares de oclusão e adesão do epitélio cólico. Entretanto, essa possibilidade não foi avaliada até a presente data.

Os resultados deste estudo parecem confirmar os benefícios do uso tópico do extrato oleoso de curcumina na mucosa do cólon excluído que desenvolve CE.

Quando avaliamos os resultados obtidos em relação ao escore inflamatório verificamos que os animais submetidos à intervenção com a curcumina apresentavam redução do escore inflamatório quando utilizamos concentrações mais elevadas (200 mg/kg/dia) por maior período de tempo (4 semanas). Apesar de não existirem estudos avaliando o efeito da curcumina na melhora do grau de inflamação da mucosa cólica em modelos de CE, esses resultados são semelhantes aos encontrados por outros autores que avaliaram a substância em modelos experimentais ou doentes com retocolite ulcerativa (LIU et al., 2013; YANG et al., 2013; SINGLA et al., 2014; XIAO et al., 2015).

A melhora do processo inflamatório na mucosa excluída de trânsito fecal nos animais submetidos à intervenção com curcumina, ficando mais evidente quando analisamos o infiltrado inflamatório por meio da expressão da enzima MPO em neutrófilos pelo estudo imuno-istoquímico. Verificamos que os animais submetidos à intervenção com extrato oleoso de curcumina, independente da concentração utilizada, bem como do tempo de intervenção proposto, apresentavam significativa redução da expressão tecidual de MPO, o que demonstra menor infiltrado neutrofílico. Verificamos que a redução do infiltrado inflamatório era diretamente relacionado à concentração utilizada uma vez que os animais submetidos a intervenção com 200 mg/kg/dia apresentavam menores níveis teciduais de MPO quando comparados aos irrigados com concentração de 50 mg/kg/dia. Constatamos ainda, que o tempo de intervenção estava também diretamente relacionado com a redução dos níveis de MPO (infiltrado neutrofílico), pois os animais submetidos à intervenção por 4 semanas, independente da concentração utilizada, cursavam com menor expressão de MPO. Estudo anterior, avaliando os níveis de MPO no cólon excluído de ratos num modelo de CE mostrou que existe aumento no infiltrado neutrofílico com o progredir do tempo de exclusão (LONGATTI et al., 2010). Nesse estudo, os autores também encontraram maiores níveis teciduais de estresse oxidativo, iNOS e COX-2 na mucosa excluída de trânsito (LONGATTI et al., 2010). Quando se sabe das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes da curcumina, os resultados deste estudo parecem, indiretamente, confirmá-las, pois a substância reduziu não só o processo inflamatório avaliado histologicamente, mas a infiltração neutrofílica. Reforçam, ainda mais, os resultados encontrados no presente estudo, pesquisas demonstrando que a administração de curcumina melhora o infiltrado neutrofílico em modelos de colite quimicamente induzida (JIAN et al., 2005; JIANG et al., 2006; CAMACHO-BARQUERO et al., 2007; DEGUCHI et al., 2007; BILLEREY-LARMONIER, et al., 2008; ARAFA et al., 2009; LARMONIER et al., 2011; VILLEGAS;

SÁNCHEZ-FIDAGO; DE LA CASTRA, 2011; MOUZAOU; RAHIM, DJERDJOURI, 2012; LIU et al., 2013; ZENG et al., 2013) assim como em portadores de retocolite ulcerativa (HOLT; KATZ; KIRSHOFF, 2005; HANAI et al., 2006a; HANAI et al., 2006b; JURENKA, 2009; LAHIFF; MOSS, 2012; BALIGA et al., 2012; KUMAR et al., 2012; BRUMATTI et al., 2014). Parece que os efeitos da curcumina são ainda melhores quando associadas ao ácido 5-ASA (LANG et al., 2015). Apesar de termos demonstrado que a aplicação de enemas com ácido 5-ASA melhora as alterações inflamatórias, estresse oxidativo e níveis de MPO, ainda não existe estudos avaliando a associação das duas substâncias no modelo de CE proposto (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al., 2011).

Quando mensuramos o conteúdo tecidual das duas principais proteínas componentes das junções de oclusão (claudina-3 e ocludina) verificamos que os animais submetidos à aplicação de enemas com curcumina apresentavam conteúdo tecidual de ambas as proteínas, significativamente maiores quando comparados aos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%. O conteúdo tecidual de claudina-3 aumentava com a concentração utilizada e com o maior tempo de intervenção. Da mesma forma, o conteúdo de ocludina também era significativamente maior, nos animais submetidos à intervenção com curcumina. Assim como ocorria com o conteúdo de claudina-3, os maiores níveis teciduais de ocludina foram encontrados nos animais submetidos à intervenção com concentração mais elevada e por maior período de tempo. O aumento no conteúdo de ambas as proteínas estavam diretamente relacionados à melhora do grau de inflamação tecidual avaliado pelo escore proposto de graduação inflamatória e pelo conteúdo tecidual de MPO. Resultados de estudos experimentais anteriores mostraram que a exclusão do trânsito fecal reduz o conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina na mucosa excluída de trânsito fecal, e que essa redução piora com o passar do tempo de exclusão fecal (CARVALHO, 2013; FERREIRA, 2013; MARTINEZ et al., 2015). Nesses estudos a redução no conteúdo de claudina-3 e ocludina estava diretamente relacionada à piora do escore inflamatório e inversamente ao estresse oxidativo. Os resultados do presente estudo mostraram que a intervenção com curcumina preserva o conteúdo tecidual de ambas as proteínas, sugerindo que a substância diminuindo o infiltrado de neutrófilos, reduza os níveis de RLO, substâncias que reconhecidamente danificam as junções de oclusão (MCKENZIE et al., 1996; GASSLER et al. 2001; KUCHARZIK et al., 2001; FU et al., 2008; BORRA et al., 2014; CARL et al., 2014; JEENGAR et al., 2014; PIECHOTA-POLANCZYK et al., 2014). É possível que os efeitos inibitórios da curcumina sobre o TNF- α , NF- κ B e INF- γ , possam reduzir a agressão inflamatória sobre as proteínas das junções de oclusão (RAO et al., 1997; RAO et al., 2002; MANKERTZ et al., 2000; MEYER et al., 2001; SAMUHASANEETO

et al., 2009; MIDURA-KIELA, 2012; MOUZAOU; RAHIM; DJERDJOURI, 2012; WANG et al., 2012; SHAKIBAEI et al., 2013).

Esses resultados parecem confirmar que os efeitos antioxidantes da curcumina estão relacionados à sua atividade anti-inflamatória (SREEJAYAN; RAO, 1996; SREEJAYAN; RAO, 1997). Estudos avaliando a integridade das junções de oclusão na mucosa inflamada de doentes com DII mostraram que existe ruptura das junções de oclusão relacionadas à piora da infiltração neutrofílica e, conseqüentemente, dos níveis teciduais de estresse oxidativo (GASSLER et al., 2001; KUCHARZIK et al., 2001; KATSUBE; TSUJI; ONODA, 2007; GÜNZEL; FROMM, 2012). Apenas três estudos avaliaram a integridade das junções de oclusão em modelo experimental de CE (CARVALHO, 2013, FERREIRA, 2013; MARTINEZ et al., 2015a). Os autores mostraram que existe queda significativa do conteúdo de claudina-3 e ocludina na mucosa exclusiva de trânsito intestinal. Os resultados desses estudos também constataram que a redução do conteúdo das proteínas estava relacionada à piora do escore inflamatório, maior intensidade de infiltrado neutrofílico e com o tempo de exclusão (CARVALHO, 2013, FERREIRA, 2013; MARTINEZ et al., 2015a). Quando se avaliou os efeitos da curcumina na colite quimicamente induzida constatou-se que a substância diminuía a lesão epitelial da mucosa cólica e preservava a integridade das junções intercelulares (TODA et al. 1999; UKIL et al., 2003; YADAV et al., 2009; SUGIMOTO et al., 2012).

Resumidamente, os resultados encontrados sugerem que a aplicação tópica de curcumina foi útil na manutenção da integridade das junções de oclusão intercelular.

Estudo experimental realizado por Parrish e colaboradores em 1999, mostrou que as proteínas componentes das junções aderentes - E-caderina e β -catenina - podem sofrer desnaturação quando expostas aos RLO (PARRISH et al., 1999). Na realidade esses autores confirmaram achados anteriores mostrando que níveis teciduais de estresse oxidativo e nitrosativo no epitélio cólico cronicamente inflamado, eram significativamente maiores quando comparado aos níveis do epitélio normal (GRISHAM; YAMADA 1992; MCKENZIE et al., 1996). Hoffmann e colaboradores em 2002/2003 confirmaram esses achados ao demonstrarem que era possível desencadear o aparecimento de colite apenas com a exposição da mucosa cólica a elevadas concentrações de RLO (HOFFMANN e al. 2002/2003). Estudos avaliando a integridade das junções enterocíticas no epitélio cólico de portadores de DII, em particular da retocolite ulcerativa, confirmaram que havia destruição das proteínas E-caderina e β -catenina (GASSLER et al., 2001, KUCHARZIK et al., 2001). O estresse oxidativo mostrava-se diretamente relacionado ao infiltrado neutrofílico e a redução da expressão de ambas as proteínas tanto no tecido inflamado quanto no tecido em

reparação (HAMBY et al., 1992; KUCHARZIK et al., 2001). O estresse oxidativo ocasionava disfunção dos genes responsáveis pela transcrição dessas proteínas (JANKOWSKI; BEDFORD; KIM, 1997). De forma oposta o controle do estresse oxidativo e nitrosativo melhorava a ruptura das proteínas dos sistemas de adesão celular induzido por RLO (KATSUBE; TSUJI; ONODA, 2007).

Todavia, embora existissem evidências mostrando que a produção aumentada de RLO representava um dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento da CE (MARTINEZ, 2010; MARTINEZ et al., 2010b), apenas na década de 2010 estudou-se em modelos experimentais, a relação entre estresse oxidativo e a integridade das junções aderentes (KADRI, 2010; FABRIS, 2011; MARTINEZ et al., 2012; KADRI et al., 2013). Os resultados desses estudos mostraram que havia redução significativa do conteúdo das proteínas E-caderina e β -catenina na mucosa exclusa de trânsito fecal e que essa redução mostrava-se inversamente relacionada ao aumento dos níveis teciduais de estresse oxidativo (MARTINEZ et al., 2012; KADRI et al., 2013).

No presente estudo quando se constatou que a aplicação tópica de curcumina preservava o conteúdo das proteínas constituintes das junções de oclusão, tornou-se interessante verificar se a substância apresentaria os mesmos efeitos em relação às junções aderentes. Cabe lembrar que estudos anteriores já tinham confirmado os efeitos antioxidantes da curcumina em portadores de DII assim como em modelos experimentais de colite (JAYAPRAKASHA et al., 2002; UKIL et al., 2003; JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH 2006; YADAV et al., 2009; UNG et al., 2010; LAHIFF; MOSS, 2011; LARMONIER et al., 2011; KUMAR et al., 2012; WANG et al., 2012; TOPCU-TARLADACALISIR et al., 2013; VECCHI BRUMATTI et al., 2014).

Com o objetivo de avaliar os efeitos protetores da curcumina na preservação da integridade das junções aderentes, neste estudo também mensuramos o conteúdo das duas principais proteínas componentes das junções aderentes: E-caderina e β -catenina. Os resultados encontrados mostraram que a intervenção preventiva do cólon excluso com extrato oleoso de curcumina foi capaz de preservar o conteúdo de ambas as proteínas. Ao analisarmos, inicialmente, o conteúdo tecidual de E-caderina constatamos que havia maior conteúdo tecidual da proteína nos animais submetidos à intervenção com a curcumina. Mesmo quando utilizamos concentrações menores, o conteúdo tecidual já era significativamente maior que os encontrados nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%. O conteúdo de E-caderina aumentava ainda mais, quando utilizamos concentrações maiores e por um período de intervenção mais prolongado. Da mesma forma como ocorreram com as duas proteínas componentes das junções de oclusão, o maior conteúdo

tecidual de E-caderina relacionava-se a melhora do escore inflamatório e a redução dos níveis teciduais de MPO, confirmando os efeitos anti-inflamatórios da substância.

Quando avaliamos o conteúdo tecidual de β -catenina verificamos que o níveis teciduais da proteína, também eram maiores nos animais submetidos à intervenção com curcumina, independente da concentração utilizada ou do tempo de intervenção. Como acontecia com a E-caderina, o maior conteúdo de β -catenina estava relacionado à melhora da inflamação tecidual e ao menor conteúdo tecidual de MPO, sugerindo uma melhora no infiltrado neutrofílico e, conseqüentemente, do processo inflamatório.

Analisados conjuntamente os resultados do presente estudo parecem confirmar os resultados de estudos anteriores realizados em modelos de colite quimicamente induzida, mostrando os efeitos anti-inflamatórios que a curcumina exerce sobre o epitélio cólico. Há muitos anos já se sabia que, a redução dos níveis de inflamação tecidual e do estresse oxidativo é um dos aspectos mais importantes na preservação da integridade epitelial e, conseqüentemente, no tratamento das DII (BABBS, 1992; JANKOWSKI et al., 1998; AW, 1999; GASSLER et al., 2001; KUCHARZIK et al., 2001). Os resultados encontrados neste estudo mostrando que a aplicação tópica de curcumina preserva um dos principais mecanismos de defesa constituintes da barreira epitelial - as junções intercelulares - confirma o potencial terapêutico da substância como estratégia adjuvante para o tratamento das colites e, em particular da CE. Os resultados do presente estudo, embora indiretamente, reforçam o papel desempenhado pelos RLO na agressão inicial às células da mucosa cólica desprovida de trânsito. Os efeitos antioxidantes da curcumina, sequestrando os RLO produzidos pelas células desprovidas de substrato energético conseqüente à derivação intestinal, impedem que esses RLO danifiquem a integridade epitelial.

Os resultados encontrados neste estudo mostraram que a aplicação tópica de enemas com curcumina mostrou-se eficaz na redução do processo inflamatório e preservação das proteínas constituintes das junções intercelulares no modelo de CE proposto. Esses achados aliados a grande biodisponibilidade da *Curcuma longa*, seu baixo custo, e aos resultados de pesquisas clínicas mostrando seu benefício no tratamento das DII sugerem que a utilização tópica da substância possa se tornar mais uma alternativa para o tratamento da CE, diminuindo o sofrimento dos doentes que já convivem com as limitações da presença do estoma.

7 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados com a metodologia adotada no presente estudo permitem concluir que:

1. A aplicação tópica de enemas diários contendo extrato oleoso de *Curcuma longa*, independente da concentração utilizada, preserva o conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina e β -catenina;
2. O conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina e β -catenina é maior nos animais submetidos à aplicação de enemas com extrato oleoso de *Curcuma longa* em concentrações mais elevadas e utilizadas por maior período de tempo;
3. A aplicação tópica de enemas com extrato oleoso de *Curcuma longa*, independente da concentração utilizada e do tempo de intervenção adotado, encontra-se associada à melhora do processo inflamatório e do infiltrado neutrofílico tecidual avaliado pelos níveis teciduais de MPO;
4. A aplicação de enemas com extrato oleoso de *Curcuma longa* demonstrou-se uma estratégia terapêutica para o tratamento da CE experimental.

8 REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B.B.; KUMAR, A.; BHARTI, A.C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Res**, v. 23, n. 1A, p. 363-398, 2003.

AGGARWAL, B.B.; SUNG, B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, n. 2, p. 85-94, 2008.

AGGARWAL, B.B.; TAKADA, Y.; OOMMEN, O.V. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 13, n. 10, p. 1327-1238, 2004.

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

AHMED, T.; GILANI, A.H. Therapeutic potential of turmeric in Alzheimer's disease: curcumin or curcuminoids? **Phytother Res**, v. 28, n. 4, p. 517-25, 2014.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular. In: *Biologia molecular da célula*. 4a. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. Cap. 19, p. 1065-1126.

ALI, T.; SHAKIR, F.; MORTON, J. Curcumin and inflammatory bowel disease: biological mechanisms and clinical implication. **Digestion**, v. 85, n. 4, p. 249-55, 2012.

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.

ALVARENGA JÚNIOR, V.; PACHECO, R.G.; ESPOSITO, C.C.; BUONGUSTO, F.; CASTELO-BRANCO, M.T.; MADI, K.; BELMIRO, C.R.; PAVÃO, M.S.; DE SOUZA, H.S.; SCHANAIDER, A. Ascidian (chordate-tunicate) and mammalian heparin enemas attenuate experimental diversion colitis. **Surgery**, v. 155, n. 2, p. 217-227, 2014.

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.

ARAUJO, C.C.; LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 723-738, 2001.

AW, T.Y. Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. **Am J Clin Nutr**, v. 70, n. 4, p. 557-565, 1999.

BABBS, C.F. Oxygen radicals in ulcerative colitis. **Free Radic Biol Med**, v. 13, n.2, p. 169-181, 1992.

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.

BERRA, C.M.; MENK, C.F.M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim Nova**, v. 29, p. 1340-1344, 2006.

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.

BONASSA, C.E.G. **Avaliação do conteúdo tecidual de sulfomucinas e sialomucinas na mucosa colica sem trânsito intestinal submetida à intervenção diária com sucralfato**. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2015.

BONASSA, C.E.G.; PEREIRA, J.A.; CAMPOS, F.G.C.M.; RODRIGUES, M.R.; DANIELA, T.S.; CHAIM, F.D.M.; MARTINEZ, C.A.R. Tissue content of sulfomucins and sialomucins in the colonic mucosa, without fecal stream, undergoing daily intervention with sucralfate. **Acta Cir Bras**, v. 30, n. 5, p. 328-338, 2015.

BONDY, S.C.; LE BEL, C.P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Rad Biol Med**, v. 14, n. 6, p. 633- 642, 1993.

BORRA, S.K.; MAHENDRA, J.; GURUMURTHY, P.; JAYAMATHI; IQBAL, S.S.; MAHENDRA, L. Effect of curcumin against oxidation of biomolecules by hydroxyl radicals. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 10, p. CC01-5, 2014.

BOSSHARDT, R.T.; ABEL, M.E. Proctitis following fecal diversion. **Dis Colon Rectum**, v. 27, n. 9, p. 605-607, 1984.

BOYANAPALLI, S.S.; TONY KONG, A.N. "Curcumin, the King of Spices": Epigenetic regulatory mechanisms in the prevention of cancer, neurological, and inflammatory Diseases. **Curr Pharmacol Rep**, v. 1, n. 2, p. 129-139, 2015.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p.206-209, 1982.

BROUET, I.; OHSHIMA, H. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 206, n. 2, p. 533-540, 1995.

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.

BUTZNER, J.D.; PARMAR, R.; BELL, C.J.; DALAL, V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. **Gut**, v. 38, n. 4, p. 568-573, 1996.

BYUN, S.Y.; KIM, D.B.; KIM, E. Curcumin ameliorates the tumor-enhancing effects of a high-protein diet in an azoxymethane-induced mouse model of colon carcinogenesis **Nutr Res**, v. 35, n. 8, p. 726-735, 2015.

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.

CALTABIANO, C.; MÁXIMO, F.R.; SPADARI, A.P.; DA CONCEIÇÃO MIRANDA, D.D.; SERRA, M.M.; RIBEIRO, M.L.; MARTINEZ, C.A. 5-aminosalicylic acid (5-ASA) can reduce

levels of oxidative DNA damage in cells of colonic mucosa with and without fecal stream. **Dis Sci**, v. 56, n. 4, p. 1037-1046, 2011.

CAMACHO-BARQUERO, L.; VILLEGAS, I.; SÁNCHEZ-CALVO, J.M.; TALERO, E.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; MOTILVA, V.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C. Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. **Int Immunopharmacol**, v. 7, n. 3, p. 333-342, 2007.

CARL, H.; CHANDNI, A.; NEHA, K.; TRISHNA, S.; VANI, R. Curcumin as a modulator of oxidative stress during storage: a study on plasma. **Transfus Apher Sci**, v. 50, n. 2, p. 288-293, 2014.

CARVALHO, V.R.J. **Avaliação do conteúdo e padrão de expressão da proteína claudina na mucosa cólica sem trânsito intestinal: estudo experimental em ratos**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2013.

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 exclusiva 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.

CHANDRAN, B.; GOEL, A. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. **Phytother Res**, v. 26, n. 11, p. 1719-1725, 2012.

CHAPMAN, K.E.; WATERS, C.M.; MILLER, W.M. Continuous exposure of airway epithelial cells to hydrogen peroxide: protection by KGF. **J Cell Physiol**, v. 192, n. 1, p. 71–80, 2002.

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. 2477-81, 1996.

CHUENGSAAMARN, S.; RATTANAMONGKOLGUL, S.; PHONRAT, B.; TUNGTRONGCHITR, R.; JIRAWATNOTAI, S. Reduction of atherogenic risk in patients with type 2 diabetes by curcuminoid extract: a randomized controlled trial. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 2, p. 144-150, 2014.

COOK, S.I.; SELLIN, J.H. Review article: short-chain fatty acids in healthy and disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 12, n. 6, p. 499-507, 1998.

CORADINI, K.; FRIEDRICH, R.B.; FONSECA, F.N.; VENCATO, M.S.; ANDRADE, D.F.; OLIVEIRA, C.M.; BATTISTEL, A.P.; GUTERRES, S.S.; DA ROCHA, M.I.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C. A novel approach to arthritis treatment based on resveratrol and curcumin co-encapsulated in lipid-core nanocapsules: In vivo studies. **Eur J Pharm Sci**, v. 78, p. 163-70, 2015.

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.

DAVID, G.G.; AL-SARIRA, A.A.; WILLMOTT, S.; CADE, D.; CORLESS, D.J.; SLAVIN, J.P. Use of Hartmann's procedure in England. **Colorectal Dis**, v. 11, n. 3, p. 308-312, 2009.

DEGUCHI, A. Curcumin targets in inflammation and cancer. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 15, n. 2, p. 88-96, 2015.

DEGUCHI, Y.; ANDOH, A.; INATOMI, O.; YAGI, Y.; BAMBIA, 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.

DEMETTER, P.; DE VOS, M.; VAN DAMME, N.; BAETEN, D.; ELEWAUT, D.; VERMEULEN, S.; MAREEL, M.; BULLOCK, G.; MIELANTS, H.; VERBRUGGEN, G.; DE KEYSER, F.; VEYS, E.M.; CUVELIER, C.A. Focal up-regulation of E-cadherin-catenin complex in inflamed bowel mucosa but reduced expression in ulcer-associated cell linkage. **Am J Clin Pathol**, v. 114, n. 3, p. 364-370, 2000.

DÍAZ OSTERMAN, C.J.; GONDA, A.; STIFF, T.; SIGARAN, U.; VALENZUELA, M.M.; FERGUSON BENNETT, H.R.; MOYRON, R.B.; KHAN, S.; WALL, N.R. Curcumin induces pancreatic adenocarcinoma cell death via reduction of the inhibitors of apoptosis pancreas. **Pancreas**, 2015 Sep 4. [Epub ahead of print].

DORUDI, S.; SHEFFIELD, J.P.; POULSOM, R.; NORTHOVER, J.M.; HART, I.R. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. **Am J Pathol**, v. 142, n. 4, p. 981-986, 1993.

DUBAND, J.L.; THIERRY, J.P. Spatio-temporal distribution of the adherens junction-associated molecules vinculin and talin in early avian embryo. **Cell Differ Dev**, v. 30, n. 1, p. 55-76, 1990.

EDWARDS, C.M.; GEORGE, B.; WARREN, B. Diversion colitis – new light through old windows. **Histopathology**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 1999.

EGGENBERGER, J.C.; FARID, A. Diversion Colitis. **Curr Treat Options Gastroenterol**, v. 4, n. 3, p. 255-259, 2001.

FABRIS, F.M. **Avaliação do conteúdo e padrão de expressão da proteína β -catenina na mucosa cólica com e sem trânsito intestinal: Estudo experimental em ratos**. 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2011.

FERGUSON, C.M.; SIEGEL, R.J. A prospective evaluation of diversion colitis. **Am Surg**, v. 57, n. 1, p. 46-49, 1991.

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.

FERREIRA, C.C. **Avaliação do padrão de expressão e conteúdo tecidual da proteína ocludina na mucosa cólica de ratos com e sem trânsito intestinal**. 2013. 75 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista. 2013.

FOLTZ-GRAY, D. Alternative treatments for arthritis. **Atlanta: Arthritis Foundation**, v. 7, p. 231-233, 2005.

FRISBIE, J.H.; AHMED, N.; HIRANO, I.; KLEIN, M.A.; SOYBEL, D.I. Diversion colitis in patients with myelopathy: clinical, endoscopic, and histopathological findings. **J Spinal Cord Med**, v; 23, n. 2, p. 142-149, 2000.

FU, Y.; ZHENG, S.; LIN, J.; RYERSE, J., CHEN, A. Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. **Mol Pharmacol**, v. 73, n. 2, p. 399-409, 2008.

GASSLER, N.; ROHR, C.; SCHNEIDER, A.; KARTENBECK, J.; BACH, A.; OBERMÜLLER, N.; OTTO, H.F.; AUTSCHBACH, F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 281, n. 1, p. G216-228, 2001.

GERAGHTY, J.M.; CHARLES, A.K. Aphthoid ulceration in diversion colitis. **Histopathology**, v. 24, n. 4, p. 395-397, 1994.

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.

GHOSH, S.; BANERJEE, S.; SIL, P.C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. **Food Chem Toxicol**, v. 83, p. 111-124, 2015.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A.B.; AGGARWAL, B.B. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 4, p. 787-809, 2008.

GRANT, N.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; HAQUE, S.; WEST, A.B. Mucosal inflammation in pediatric diversion colitis: a quantitative analysis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 25, n. 3, p. 273-280, 1997.

GRISHAM, M.B.; YAMADA, T. Neutrophils, nitrogen oxides, and inflammatory bowel disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 664, p. 103-115, 1992.

GUILLEMOT, F.; COLOMBEL, J.F.; NEUT, C.; VERPLANCK, N.; LECOMTE, M.; ROMOND, C.; PARIS, J.C.; CORTOT, A. Treatment of diversion colitis by short-chain fatty acids. Prospective and double-blind study. **Dis Colon Rectum**, v. 34, n. 10, p. 861-864, 1991.

GUMBINER, B.M.; MCREA, P.D. Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. **J Cell Sci Suppl**, v. 17, p. 155-158, 1993.

GUNDLING, F.; TILLER, M.; AGHA, A.; SCHEPP, W.; IESALNIEKS, I. Successful autologous fecal transplantation for chronic diversion colitis. **Tech Coloproctol**, v. 19, n. 1, p. 51-52, 2015.

GÜNZEL, D.; FROMM, M. Claudins and other tight junction proteins. **Compr Physiol**, v. 2, n. 3, p. 1819-52, 2012.

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.

GUZMAN-VILLANUEVA, D.; EL-SHERBINY, I.M.; HERRERA-RUIZ, D.; SMYTH, H.D. Design and in vitro evaluation of a new nano-microparticulate system for enhanced aqueous-phase solubility of curcumin. **Biomed Res Int**, v. 2013; p. 724763, 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 consequências. **Rev bras Coloproctol**, v. 17; p. 5-10, 1997.

HANAI, H.; IIDA, T.; TAKEUCHI, K.; WATANABE, F.; MARUYAMA, Y.; ANDOH, A.; TSUJIKAWA, T.; FUJIYAMA, Y.; MITSUYAMA, K.; SATA, M.; YAMADA, M.; IWAOKA, Y.; KANKE, K.; HIRAIISHI, H.; HIRAYAMA, K.; ARAI, H.; YOSHII, S.; UCHIJIMA, M.; NAGATA, T.; KOIDE, Y. Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 4, n. 12, p. 1502-1506, 2006.

HANBY, A.M.; CHINERY, R.; POULSOM, R.; PLAYFORD, R.J.; PIGNATELLI, M. Down regulation of E-cadherin in the reparative epithelium of the human gastrointestinal tract. **Am J Pathol**, v. 148, n. 3, p. 723-729, 1996.

HAORAH, J.K.B.; GORANTLA, S.; ZHENG, J.; PERSIDSKY, Y. Alcohol-induced blood-brain barrier dysfunction is mediated via inositol 1,4,5-triphosphate receptor IP3R-gated intracellular calcium release. **J Neurochem**, v. 100, n. 2, p. 324-336, 2007.

HAQUE, S.; EISEN, RN.; WEST, AB. The morphologic features of diversion colitis: studies of a pediatric population with no other disease of the intestinal mucosa. **Hum Pathol**, v. 24, n. 2, p. 211-219, 1993.

HAQUE, S.; WEST, A.B. Diversion colitis--20 years a-growing. **J Clin Gastroenterol**, v. 15, n. 4, p. 281-283, 1992.

HARIG, J.M.; SOERGEL, 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.

HARTY, R.F. Energy, oxidative stress, and inflammation in the colon. **Dig Dis Sci**, v. 58, n. 12, p. 3386-3388, 2013.

HASAN, S.T.; ZINGG, J.M.; KWAN, P.; NOBLE, T.; SMITH, D.; MEYDANI, M. Curcumin modulation of high fat diet-induced atherosclerosis and steatohepatosis in LDL receptor deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 232, n. 1, p. 40-51, 2014.

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.

HODGSON, R.; AN, V.; STUPART, D.A.; GUEST, G.D.; WATTERS, D.A. Who gets Hartmann's reversed in a regional centre? **Surgeon**, v. pii: S1479-666X, n. 14, p. 00142-145, 2015.

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, 2002-2003.

HOLT, P.R.; KATZ, S.; KIRSHOFF, R. Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: a pilot study. **Dig Dis Sci**, v. 50, n. 11, p. 2191-2193, 2005.

JAISWAL, A.S.; MARLOW, B.P.; GUPTA, N.; NARAYAN, S. Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. **Oncogene**, v. 21, n. 55, p. 8414-8427, 2002.

JANKOWSKI, J.A.; BEDFORD, F.K.; BOULTON, R.A.; CRUICKSHANK, N.; HALL, C.; ELDER, J.; ALLAN, R.; FORBES, A.; KIM, Y.S.; WRIGHT, N.A.; SANDERS, D.S. Alterations in classical cadherins associated with progression in ulcerative and Crohn's colitis. **Lab Invest**, v. 78, n. 9, p. 1155-1167, 1998.

JANKOWSKI, J.A.; BEDFORD, F.K.; KIM, Y.S. Changes in gene structure and regulation of E-Cadherin during epithelial development, differentiation, and disease. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 57, p. 187-215, 1997.

JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S.; NEGI, P.S.; SAKARIAH, K.K. Evaluation of antioxidant activities and antimutagenicity of turmeric oil: a byproduct from curcumin production. **Z Naturforsch C**, v. 57, n. 9-10, p. 828-835, 2002.

JAYAPRAKASHA, G.K.; RAO, L.J.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Food Chemistry**, v. 98, p. 720-724, 2006.

JEENGAR, M.K.; SHRIVASTAVA, S.; NAIR, K.; SINGAREDDY, S.R.; PUTCHA, U.K.; TALLURI, M.V.; NAIDU, V.G.; SISTLA, R. Improvement of bioavailability and anti-inflammatory potential of curcumin in combination with emu oil. **Inflammation**, v 37, n. 6, p. 2139-2155, 2014.

JIAN, Y.T.; MAI, G.F.; WANG, J.D.; ZHANG, YL.; LUO, R.C.; FANG, Y.X. Preventive and therapeutic effects of NF-kappaB inhibitor curcumin in rats colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 12, p. 1747-1752, 2005.

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.

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.

KABIR, S.I.; KABIR, S.A.; RICHARDS, R.; AHMED, J.; MACFIE, J. Pathophysiology, clinical presentation and management of diversion colitis: a review of current literature. **Int J Surg**, v. 12, n. 10, p. 1088-1092, 2014.

KADRI, C.J. **Efeito do estresse oxidativo sobre os níveis de E-caderina na mucosa cólica de ratos com e sem trânsito intestinal**. 2010. 125 f. Dissertação (Mestrado em

Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2010.

KADRI, C.J.; PEREIRA, J.A.; DA SILVA, C.M.; NONOSE, R.; NASCIMENTO, E.F.; JACOMO, A.L.; MARTINEZ, C.A. E-cadherin expression in colonic mucosa with and without fecal stream. **J Invest Surg**, v. 26, n. 2, p. 72-79, 2013.

KATSUBE, T.; TSUJI, H.; ONODA, M. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in monolayers of intestinal epithelial cell. **Biochim Biophys Acta**, v.1773, n. 6, p. 794-803, 2007.

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.

KIM, D.C.; KU, S.K., BAE, J.S. Anticoagulant activities of curcumin and its derivatives. **BMB Rep**, v. 45, n. 4, p. 221-226, 2012.

KISO, Y.; SUZUKI, Y.; WATANABE, N.; OSHIMA, Y.; HIKINO, H. Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* rhizomes. **Planta Med**, v. 49, n. 3, p. 185-187, 1983.

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.

KUCHARZIK, T.; WALSH, S.V.; CHEN, J.; PARKOS, C.A.; NUSRAT, A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. **Am J Pathol**, v. 159, n. 6, p. 2001-2009, 2001.

KUMAR, S.; AHUJA, V.; SANKAR, M.J.; KUMAR, A.; MOSS, A.C. Curcumin for maintenance of remission in ulcerative colitis. **Cochrane Database Syst Rev**,17;10:CD008424, 2012.

LAHIFF, C.; MOSS, A.C. Curcumin for clinical and endoscopic remission in ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 7, p. E66, 2011.

LAMEIRO, T.M.M.; SILVA, C.M.G.; MARQUES, L.H.S.; CUNHA, F.L.; ALMEIDA, M.G.; PEREIRA, J.A.; MARTINEZ, C.A.R. Efeitos do butirato nos níveis de peroxidação lipídica em células da mucosa cólica sem trânsito fecal: estudo experimental em ratos. **Rev bras. coloproctol**, v. 31, n. 2, p. 155-164, 2011.

LAMPE, V. MILOBEDZKA J.J **Ver Dtsch Chem Ges**, v. 46, p. 2235, 1913.

LANG, A.; SALOMON, N.; WU, J.C.; KOPYLOV, U.; LAHAT, A.; HAR-NOY, O.; CHING, J.Y.; CHEONG, P.K.; AVIDAN, B.; GAMUS, D.; KAIMAKLIOTIS, I.; ELIAKIM, R.; NG, S.C.; BEN-HORIN, S. Curcumin in combination with mesalamine induces remission in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis in a randomized controlled trial. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 13; n. 8, p. 1444-1440, 2015.

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. G1079-1091, 2008.

LE, H.T.; SIN, W.C.; LOZINSKY, S.; BECHBERGER, J.; VEGA, J.L.; GUO, X.Q.; SÁEZ, J.C.; NAUS, C.C. Gap junction intercellular communication mediated by connexin43 in astrocytes is essential for their resistance to oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 289, n. 3, p. 1345-1354, 2014.

LIMTRAKUL, P.; LIPIGORNGOSON, S.; NAMWONG, O.; APISARIYAKUL, A.; DUNN, F.W. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. **Cancer Lett**, v. 116, n. 2, p. 197-203, 1997.

LIU, L.; LIU, Y.L.; LIU, G.X.; CHEN, X.; YANG, K.; YANG, Y.X.; XIE, Q.; GAN, H.K.; HUANG, X.L.; GAN, H.T. Curcumin ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis by blocking STAT3 signaling pathway. **Int Immunopharmacol**, v. 17, n. 2, p. 314-320, 2013.

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.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. A integração das células nos tecidos. In: *Biologia celular e molecular*. 4^a.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. Cap.22, p.968-1002.

LONGATTI, T.S.; ACEDO, S.C.; DE OLIVEIRA C.C.; MIRANDA, D.D.; RIBEIRO, M.L.; GAMBERO, A.; MARTINEZ, C.A. Inflammatory alterations in excluded colon in rats: a comparison with chemically induced colitis. **Scand J Gastroenterol**, v. 45, n.3, p. 315-324, 2010.

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.

LUSK, L.B.; REICHEN, J.; LEVINE, J.S. Aphthous ulceration in diversion colitis. Clinical implications. **Gastroenterology**, v. 87, n. 5, p. 1171-1173, 1984.

MA, T.Y.; IWAMOTO, G.K.; HOA, N.T., AKOTIA, V.; PEDRAM, A.; BOIVIN, M.A.; SAID, H.M. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 286, n. 3, p. G367-376, 2004.

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.

MANKERTZ, J.; TAVALLALI, S.; SCHMITZ, H.; MANKERTZ, A.; FROMM, M.; SCHULZKE, J.D. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor α and interferon γ . **J Cell Sci**, v. 113, n. Pt 11, p. 2085-2090, 2000.

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.

MARTELLI, L.; RAGAZZI, E.; DI MARIO, F.; MARTELLI, M.; CASTAGLIUOLO, I.; DAL MASCHIO, M.; PALÙ, G.; MASCHIETTO, M.; SCORZETO, M.; VASSANELLI, S.; BRUN, P. A potential role for the vanilloid receptor TRPV1 in the therapeutic effect of curcumin in dinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in mice. **Neurogastroenterol Motil**, v. 19, n. 8, p. 668-674, 2007.

MARTINEZ, C.A.R. **Avaliação dos níveis de estresse oxidativo e modificações no conteúdo e padrão de expressão das proteínas E-caderina e β -catenina na mucosa cólica sem trânsito fecal: Estudo experimental em ratos.** 2010, 181 f. Tese (Livre-Docência em Cirurgia). Universidade de São Paulo, São Paulo. 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.; FABRIS, F.M.; SILVA, C.M.G.; RODRIGUES, M.R.; SATO, D.T.; RIBEIRO, M.L.; PEREIRA, J.A. Oxidative stress and changes in the content and pattern of tissue expression of β -catenin protein in diversion colitis. **J. Coloproctol. (Rio J.)**, v. 32, n. 4, p. 343-358, 2012.

MARTINEZ, C.A.R.; NONOSE, R.; SPADARI, A.P.P.; MÁXIMO, F.R.; PRIOLLI, D.G.; PEREIRA, J.A.; MARGARIDO, N.G. Quantification by computerized morphometry of tissue

levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. **Acta Cir Bras**, v. 25, n. 3, p. 231-240, 2010a.

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.; DE CAMPOS, F.G.; DE CARVALHO, V.R.; DE CASTRO FERREIRA, C.; RODRIGUES, M.R.; SATO, D.T.; PEREIRA, J.A. Claudin-3 and occludin tissue content in the glands of colonic mucosa with and without a fecal stream. **J Mol Histol**, v. 46, n. 2, p.183-194, 2015a.

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.

MCKENZIE S.J.; BAKER, M.S; BUFFINTON, G.D.; DOE, W.F. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. **J Clin Invest**, v. 98, n. 1, p. 136-141, 1996.

MEES, S.T.; MENNIGEN, R.; SPIEKER, T.; RIJCKEN, E.; SENNINGER, N.; HAIER, J.; BRUEWER, M. Expression of tight and adherens junction proteins in ulcerative colitis associated colorectal carcinoma: upregulation of claudin-1, claudin-3, claudin-4, and beta-catenin. **Int J Colorectal Dis**, v. 24, n. 4, p. 361-368, 2009.

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.

MEYER, T.N.; SCHWESINGER, C.; YE, J.; DENKER, B.M.; NIGAM, S.K. Reassembly of the tight junction after oxidative stress depends on tyrosine kinase activity. **J Biol Chem**, v. 276, n. 25, p. 22048-22055, 2001.

MIDURA-KIELA, M.T.; RADHAKRISHNAN, V.M.; LARMONIER, C.B.; LAUBITZ, D.; GHISHAN, F.K.; KIELA, P.R. Curcumin inhibits interferon- γ signaling in colonic epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 302, n. 1, p. G85-96, 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.

MOEINIAN, M.; GHASEMI-NIRI, S.F.; MOZAFFARI, S.; ABDOLGHAFARI, 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.

MORIN, P.J.; SPARKS, A.P.; CORINEK, V.; BARKER, N.; CLEAVER, S.H.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Activation in B-catenin-TCF signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. **Science**, v. 275, n. 5307, p. 1787-1790, 1997.

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.

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

MUKHERJEE, P.K.; WAHILE, A. Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian system of medicines. **J Ethnopharmacol**, v. 103, n. 1, p. 25-35, 2006.

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.

NAGAFUCHI, A.; TAKEICHI, M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. **EMBO J**, v. 7, n. 12, p. 3679-3684, 1988.

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.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J Nat Prod**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NONES, K.; DOMMELS, Y.E.; MARTELL, S.; BUTTS, C.; MCNABB, W.C.; PARK, Z.A.; ZHU, S.; HEDDERLEY, D.; BARNETT, M.P.; ROY, N.C. The effects of dietary curcumin and rutin on colonic inflammation and gene expression in multidrug resistance gene-deficient (*mdr1a*^{-/-}) mice, a model of inflammatory bowel diseases **Br J Nutr**, v. 101, n. 2, p. 169-181, 2009.

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.

OZAWA, M.; RINGWALD, M.; KEMLER, R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, n. 11, p. 4246-4250, 1990.

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.

PARRISH, A.R.; CATANIA, J.M.; OROZCO, J.; GANDOLFI, A.J. Chemically induced oxidative stress disrupts e-cadherin/catenin cell adhesion complex. **Toxicol Sci**, v. 51, n. 1, p. 80-86, 1999.

PEĆINA-SLAUS, N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. **Cancer Cell Int**, v. 30, n. 10, p. 22, 2010.

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.

PRASAD, C.P.; RATH, G.; MATHUR, S.; BHATNAGAR, D.; RALHAN, R. Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt/beta-catenin signaling. **Chem Biol Interact**, v. 181, n. 2, p. 263-271, 2009.

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

RAHMANI, A.H.; AL ZOHAIRY, M.A.; ALY, S.M.; KHAN, M.A. Curcumin: a potential candidate in prevention of cancer via modulation of molecular pathways. **Biomed Res Int**, v. 2014; p. 761608, 2014

RAO, R.K.; BAKER, R.D.; BAKER, S.S.; GUPTA, A.; HOLYCROSS, M. Oxidant induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. **Am J Physiol**, v. 273, n. 4 Pt1, p. G812-G823, 1997.

RAO, R.K.; BASUROY, S.; RAO, V.U.; KARNAKY JR, K.J.; GUPTA, A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin- β -catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. **Biochem J**, v. 368, n. Pt2, p. 471-481, 2002.

REDDY, A.C.; LOKESH, B.R. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. **Food Chem Toxicol**, v. 32, n. 3, p. 279-283, 1994a.

REDDY, A.C.; LOKESH, B.R. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. **Mol Cell Biochem**, v. 111, n. 1. p. 2117-2124, 1994b.

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.

ROIG, J.V.; CANTOS, M.; BALCISCUETA, Z.; URIBE, N.; ESPINOSA, J.; ROSELLÓ, V.; GARCÍA-CALVO, R.; HERNANDIS, J.; LANDETE, F.; Sociedad Valenciana de Cirugía Cooperative Group. Hartmann's operation: how often is it reversed and at what cost? A multicentre study. **Colorectal Dis**, v. 13, n. 12, p. e396-402, 2011.

SAITOU, M.; FURUSE, M.; SASAKI, H.; SCHULZKE, J.D.; FROMM, M.; TAKANO, H.; NODA, T.; TSUKITA, S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. **Mol Biol Cell**, v. 11, n. 12, p. 4131-4142, 2000.

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. G235-243, 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. 2009, p. 981963, 2009.

SAREEN, R.; JAIN, N.; PANDIT, V. Curcumin: a boon to colonic diseases. **Curr Drug Targets**, v. 14, n. 10, p. 1210-1218, 2013.

SAREEN, R.; JAIN, N.; RAJKUMARI, A.; DHAR, K.L. pH triggered delivery of curcumin from Eudragit-coated chitosan microspheres for inflammatory bowel disease: characterization and pharmacodynamic evaluation. **Drug Deliv**, v. 21, p. 1-8, 2015.

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. 2014, p. 240701, 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, n. Suppl, p. 53-57, 1997.

SCHMEHL, K.; FLORIAN, S.; JACOBASCH, G.; SALOMON, A.; KORBER, J. Deficiency of epithelial basement membrane laminin in ulcerative colitis affected human colonic mucosa. **Int J Colorectal Dis**, v. 15, n. 1, p. 39-48, 2000.

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.

SHAMI, N.J.I.E; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Nutr**, v. 17, p. 227-236, 2004.

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- κ B and Src protein kinase signaling pathways. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57218, 2013.

SHEENAN, 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 H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 289, n. 13, p. 8735-8741, 2014.

SINGER, A.A.; ADLER, J. What role do immunomodulators have in assessing response to curcumin as an add-on therapy for patients with ulcerative colitis? **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. pii: S1542-3565, n. 15, p. 01205-01207, 2015

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.

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.

SPRAY, D.C. Illuminating gap junctions. **Nat Methods**, v. 2, n. 1, p. 12-14, 2005.

SREEJAYAN, N.; RAO, M.N. Free radical scavenging activity of curcuminoids. **Arzneimittelforschung**, v. 46, n. 2, p. 169-171, 1996.

SREEJAYAN, N.; RAO, M.N. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. **J Pharm Pharmacol**, v. 49, n. 1, p. 105-107, 1997.

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.

SUSKIND, D.L.; WAHBEH, G.; BURPEE, T.; COHEN, M.; CHRISTIE, D.; WEBER, W. Tolerability of curcumin in pediatric inflammatory bowel disease: a forced-dose titration study. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 56, n. 3, p. 277-279, 2013.

TAYLOR, R.A.; LEONARD, M.C. Curcumin for inflammatory bowel disease: a review of human studies. **Altern Med Rev**, v. 16, n. 2, p. 152-156, 2011.

TANNISHTHA, R.; HANS, C. Wnt signalling in stem cells and cancer. **Nature**, v. 434, p. 843-850, 2005.

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.

TODA, S.; OHNISHI, M.; KIMURA, M.; NAKASHIMA, K. Action of curcuminoids on the hemolysis and lipid peroxidation of mouse erythrocytes induced by hydrogen peroxide. **J Ethnopharmacol**, v. 23, n. 1, p. 105-108, 1988.

TOPCU-TARLADACALISIR, Y.; AKPOLAT, M.; UZ, Y.H.; KIZILAY, G.; SAPMAZ-METIN, M.; CERKEZKAYABEKIR, A.; OMURLU, I.K. Effects of curcumin on apoptosis and oxidoinflammatory regulation in a rat model of acetic acid-induced colitis: the roles of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. **J Med Food**, v. 16, n. 4, p. 296-305, 2013.

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.

UNNIKRISHNAN, M.K.; RAO, M.N. Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin. **Mol Cell Biochem**, v. 146, n. 1, p. 35-37, 1995.

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.

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 APPswe/PS1dE9 mice. **J Neurosci Res**, v. 92, n. 2, p. 218-231, 2014.

WANG, N.; WANG, G.; HAO, J.; MA, J.; WANG, Y.; JIANG, X.; JIANG, H. Curcumin ameliorates hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by upregulating heme oxygenase-1 expression in human intestinal epithelial cells. **Dig Dis Sci**, v. 57, n. 7, p. 1792-1801, 2012.

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.

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.

XIAO, B.; SI, X.; ZHANG, M.; MERLIN, D. Oral administration of pH-sensitive Curcumin-loaded microparticles for ulcerative colitis therapy. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 135, p. 379-385, 2015.

XU, M.X.; ZHAO, L.; DENG, C.; YANG, L.; WANG, Y.; GUO, T.; LI, L.; LIN, J.; ZHANG, L. Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via the wnt signaling pathway **Int J Oncol**, v. 43, n. 6, p. 1951-1959, 2013.

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- κ 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.

ZHOU, Q.; YE, M.; LU, Y.; ZHANG, H.; CHEN, Q.; HUANG, S.; SU, S. Curcumin improves the tumoricidal effect of mitomycin C by suppressing ABCG2 expression in stem cell-like breast cancer cells. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136694, 2015.

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

ANEXO II - Planilhas com os resultados finais para as variáveis analisadas

Variáveis (Média ± Erro Padrão)						
Variável	2 Semanas			4 Semanas		
	SF 0,9%	Curcumina 50mg/kg/dia	Curcumina 200mg/kg/dia	SF 0,9%	Curcumina 50mg/kg/dia	Curcumina 200mg/kg/dia
Escore	4,4±0,9	3,0±1,0	2,0±0,7	3,6±1,1	3,0±0,9	1,3±0,5
Claudina-3	8,39±0,07	14,35±0,89	19,69±0,83	7,55±0,89	16,95±1,26	20,94±0,94
Ocludina	9,73±1,02	13,57±0,69	15,45±0,45	13,95±0,63	20,99±0,77	17,59±0,53
E-caderina	2,78±1,36	21,19±1,03	23,24±0,84	3,58±0,22	20,99±0,77	24,25±0,55
β-catenina	4,20±1,30	20,14±0,99	20,99±0,84	5,55±0,26	23,24±0,67	24,85±0,75
MPO	21,81±4,24	4,13±1,90	1,01±0,66	21,91±3,41	2,25±1,37	0,85±0,40

ANEXO III - Artigo publicado

1) **KADRI, C.J.**; PEREIRA, J.A.; DA SILVA, C.M.G.; NONOSE, R.; NASCIMENTO, E.F.; JÁCOMO, A.L.; MARTINEZ, C.A.R. E-cadherin expression in colonic mucosa with and without fecal stream. ***Journal of Investigative Surgery***, v. 26, n. 2, p. 72-79, 2013.

ANEXO IV - Trabalhos apresentados em Congressos Médicos

- 1) **KADRI, C.J.**; MARTINEZ, C.A.R. Conteúdo tecidual das proteínas B-catenina e E-caderina na mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal submetida a aplicação de enemas contendo extrato oleoso de *Curcuma longa* (curcumina). In: XXI Encontro de Iniciação Científica, XIV Encontro de Pós-Graduação, X Encontro de Extensão Universitária, VII Seminário de Estudos do Homem Contemporâneo, 2015, Campinas. Anais Eletrônicos do XXI Encontro de Iniciação Científica, XIV Encontro de Pós-Graduação, X Encontro de Extensão Universitária, VII Seminário de Estudos do Homem Contemporâneo. Bragança Paulista: Universidade São Francisco, v. 1, p. 18-18, 2015.
- 2) BRAGION, C.B.; RODRIGUES, M.R.; SATO, D.T.; **KADRI, C.J.**; PEREIRA, J. A.; MARTINEZ, C.A.R. Avaliação dos efeitos da intervenção com extrato oleoso de *Curcuma longa* (Curcumina) no conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, E-caderina e B-catenina na mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal. In: XXXI Congresso Brasileiro de Cirurgia, 2015, Curitiba. Anais eletrônicos do XXXI Congresso Brasileiro de Cirurgia. Curitiba: Colégio Brasileiro de Cirurgiões, v. 1, p. EP-491-E-491, 2015.
- 3) SATO, D.T.; **KADRI, C.J.**; CAMPOS, F.G.C.M.; RODRIGUES, M.R.; BRAGION, C.B.; MENDONÇA, R.L.S.; PEREIRA, J.A.; MARTINEZ, C.A.R. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato oleoso de *Curcuma longa* (Curcumina) no tratamento da colite de exclusão: Estudo experimental em ratos. In: 64o. Congresso Brasileiro de Coloproctologia, 2015, Rio de Janeiro. Programa Científico do 64o. Congresso Brasileiro de Coloproctologia. Rio de Janeiro: SBCEP v. 1, p. 59-59, 2015.
- 4) BRAGION, C.B.; **KADRI, C.J.**; CAMPOS, F.G.C.M.; SATO, D.T.; RODRIGUES, M.R.; RIBEIRO, P.F.; PEREIRA, J.A.; MARTINEZ, C.A.R. Influência da aplicação de clisteres contendo extrato oleoso de *Curcuma longa* (Curcumina) no conteúdo tecidual da proteína B-catenina no epitélio sem trânsito intestinal. In: 64o. Congresso Brasileiro de Coloproctologia, 2015, Rio de Janeiro. Programa Científico do 64o. Congresso Brasileiro de Coloproctologia. Rio de Janeiro: SBCEP, v. 1, p. 74-74, 2015.
- 5) KADRI, C.J.; BRAGION, C.B.; CAMPOS, F.G.C.M.; RODRIGUES, M.R.; SATO, D.T.; RIBEIRO, P.F.; PEREIRA, J.A.; MARTINEZ, C.A.R. Avaliação dos efeitos da aplicação de enemas contendo extrato oleoso de *Curcuma longa* (Curcumina) no conteúdo tecidual de ocludina na mucosa cólica desprovida de trânsito fecal. In: 64o. Congresso Brasileiro de

Coloproctologia, 2015, Rio de Janeiro. Programa Científico do 64o. Congresso Brasileiro de Coloproctologia. Rio de Janeiro: SBCP, v. 1, p. 98-98, 2015.

6) BRAGION, C.B.; PELAQUIM, S.J.; KANNO, D.T.; MENDONÇA, RLS; **KADRI, C.J.**; NONOSE, R.; NASCIMENTO, E.F.R.; MARTINEZ, C.A.R. Vasculite mesentérica pós-operatória de apendicectomia laparoscópica: relato de caso. In: 63o. Congresso Brasileiro de Coloproctologia, 2014, Brasília. Programa final do 63o. Congresso Brasileiro de Coloproctologia. Rio de Janeiro: SBCP, v. 1. p. 67-67, 2014.

7) BRAGION, C.B.; PELAQUIM, S.J.; KANNO, D.T.; MENDONÇA, R.L.S; **KADRI, C.J.**; NONOSE, R.; MARTINEZ, C.A.R. Vasculite mesentérica pós-operatória de apendicectomia laparoscópica: relato de caso. In: Congresso Paulista de Cirurgia - 2014, 2014, São Paulo. Resumo dos Trabalhos apresentados no Congresso Paulista de Cirurgia - 2014. São Paulo: CBC-SP, v. 1, p. 96-96, 2014.