

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Efeito *in vivo* da dispersão sólida de curcumina em alterações metabólicas e imunológicas durante sepse experimental e efeito *in vitro* sobre a síntese de NO por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo”

Letycia Silvano da Silva

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Efeito *in vivo* da dispersão sólida de curcumina em alterações metabólicas e imunológicas durante sepse experimental e efeito *in vitro* sobre a síntese de NO por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Letycia Silvano da Silva

Orientadora: Maria José Alves da Rocha

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 06 de dezembro de 2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2013

Resumo

Silva, L.S. “**EFEITO *IN VIVO* DA DISPERSÃO SÓLIDA DE CURCUMINA EM ALTERAÇÕES METABÓLICAS E IMUNOLÓGICAS DURANTE SEPSE EXPERIMENTAL E EFEITO *IN VITRO* SOBRE A SÍNTESE DE NO POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR LIPOPOLISSACARÍDEO**”. 2013. 89f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.

Trabalhos sugerem que a curcumina pode atuar na sepse diminuindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios e de radicais livres. Na busca por aumentar sua biodisponibilidade, foi desenvolvido um processo fitotecnológico que gerou uma dispersão sólida de curcumina chamada DS17. O objetivo do nosso trabalho foi verificar a atividade biológica da dispersão sólida de curcumina (DS17) nas alterações imunológicas e metabólicas, utilizando modelo *in vivo* de sepse induzida em ratos por CLP, bem como avaliar as concentrações de nitrito *in vitro* em cultura de macrófagos peritoneais de animais sépticos e estimulados por LPS. Para os estudos *in vivo* ratos Wistar machos (250 a 300g) foram divididos em dois grupos, sepse polimicrobiana pelo modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP) e operação fictícia (OF) sem ligadura ou perfuração do ceco. Esses animais foram pré-tratados com DS17 (100mg/kg), via oral, por 7 dias antes da indução da sepse e tratados 2 horas após o estímulo séptico. Um grupo de animais teve a sobrevida avaliada por 48 horas, o outro foi decapitado e teve o sangue coletado para análise de citocinas, proteína Heat shock 70 (HSP70), óxido nítrico (NO), volemia e glicemia e um terceiro grupo foi usado para avaliar a absorção de curcumina, por HPLC. Para os estudos *in vitro* foi realizada a cultura de macrófagos peritoneais tratados com DS17 e estimulados com LPS por 24 horas. Nossos resultados mostraram que a DS17 exerceu atividade biológica quando diminuiu as concentrações de IL-1 β e IL-6 tanto no plasma como no lavado peritoneal 6 e 24 horas após a sepse, mas aumentou as concentrações plasmáticas de IL-6, 4 horas após a sepse. Adicionalmente melhorou a hiperglicemia de fase aguda e a hipovolemia de fase tardia da sepse. Já as concentrações de IL10 plasmática e HSP 70 sérica diminuíram no período de 24 horas, enquanto o NO plasmático e a glicemia aumentaram nesse mesmo período. A análise da absorção da curcumina mostrou que ela está presente no plasma 4 e 6 horas, mas ausente 24 horas após a última administração de DS17. Essas alterações não foram suficientes para modificar significativamente a sobrevida, embora tenhamos observado pontualmente uma aparente melhora biológica de 20% em 24 horas. O tratamento da cultura de macrófagos com DS17 diminuiu a produção de NO que se seguiu à aplicação de LPS mostrando assim sua ação antioxidante *in vitro*. Nossos resultados sugerem que apesar do efeito oxidante da DS17 em modelo *in vivo* de sepse experimental, a mesma foi capaz de melhorar os parâmetros metabólicos e alterar a produção de citocinas pró e antiinflamatórias durante a fase aguda e tardia da sepse. Entretanto mais estudos são necessários para esclarecer o proposto efeito antiinflamatório e oxidante da curcumina durante a sepse experimental.

Palavras Chave: sepse, CLP, curcumina, dispersão sólida, citocinas, metabólico, antioxidant

Abstract

Silva, L.S. “*IN VIVO* EFFECTS OF SOLID DISPERSION OF CURCUMIN IN METABOLIC AND IMMUNOLOGICAL ALTERATIONS DURING EXPERIMENTAL SEPSIS AND *IN VITRO* EFFECT ON THE NO SYNTHESIS OF MACROPHAGE STIMULATED WITH LIPOPOLYSACCHARIDE”. 2013. 89f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013

Studies suggest that curcumin may act in sepsis by decreasing the release of pro-inflammatory mediators and free radicals. In search to increase the curcumin's bioavailability was developed a phytothechnological process that generated a solid dispersion of curcumin named DS17. The aim of our study was to assess the biological activity of the solid dispersion of curcumin (DS17) in immunological and metabolical alterations observed in an *in vivo* model of sepsis in rats induced by CLP as well as to evaluate the concentration of nitrite *in vitro* in peritoneal macrophages culture of naïve rats and stimulated with LPS. For *in vivo* studies male Wistar rats (250 to 300 g) were divided into two groups, polymicrobial sepsis model by cecal ligation and puncture (CLP) and sham operation (OF) without cecal ligation and puncture. The animals were pretreated with DS17 (100mg/kg) orally for 7 days prior to CLP and treated 2 hours after surgery. One group of animals had the survival rate assessed for 48 hours, the other group was decapitated and the blood used to analyze cytokines, HSP 70, NO production, volemia and glicemia, a third group was used to analyze curcumin absorption through HPLC. The *in vitro* studies were performed with intraperitoneal macrophages culture, treated with DS17 and stimulated with LPS for 24 hours. The dispersion decreased plasma IL-1 β and IL-6 in plasma and peritoneal fluid, 6 and 24 hours after the sepsis stimulus. Additionally the DS17 improved the hyperglycemia of acute phase and hypovolemia of late phase of sepsis. On the other hand, plasma IL-10 and serum HSP70 decreased in 24 hours while plasma NO and glycemia increased in the same period. Moreover the HPLC results showed that curcumin is present in the plasma 4 and 6 hours, but absent 24 hours following the last DS17 administration. These changes were not sufficient to increase significantly the survival though we observed an apparent biological improvement of 20%, 24 hours following CLP. The DS17 treatment of macrophages reduced their NO production following LPS stimulus, showing an antioxidant effect *in vitro*. Our results suggest that despite the oxidant effect of DS17 in vivo experimental sepsis model, the dispersion has been able to improve metabolic parameters and change the production of proinflammatory and anti-inflammatory during the acute phase and late sepsis. However more studies are needed to clarify the proposed oxidant and anti-inflammatory effect of curcumin during experimental sepsis.

Keywords: sepsis, CLP, curcumin solid dispersion, cytokines, metabolic, antioxidant

Resumen

Silva, LS. “Efecto *in vivo* de la dispersión sólida de la curcumina en la alteraciones metabólicas y inmunológicas durante sepsis experimental y efecto *in vitro* sobre la síntesis de NO por macrófagos estimulados por lipopolisacárido”, 2013. 89f. Disertación (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013

Trabajos sugieren que la Curcumina puede actuar en la sepsis, disminuyendo la liberación de los mediadores inflamatorios y de los radicales libres. En la búsqueda por aumentar su disponibilidad, fue desarrollado un proceso fito tecnológico que generó una dispersión sólida de la Curcumina, esa dicha DS17. El objetivo de nuestro trabajo, fue averiguar la actividad biológica de esa dispersión sólida de la Curcumina (DS17) en las alteraciones inmunológicas y metabólicas, utilizando el modelo *in vivo* de la sepsis inducida en ratas por CLP, también como evaluar las concentraciones del nitrito *in vitro* en la cultura de macrófagos peritoneales de animales sépticos y estimulados por LPS. Para los estudios *in vivo*, ratas Wistar varones (250 a 300 g) fueron seleccionados en dos grupos por sepsis polimicrobiana por el modelo de ligadura y perforación en ceco (CLP) y operación ficticia (OF) sin ligadura o perforación del ceco. Esos animales fueron pre tratados con DS17 (100mg/kg) por vía oral, por 7 días antes de la inducción de la sepsis y tratados 2 horas después el estímulo séptico. Un grupo de animales tuvieron la sobrevivencia evaluada por 48 horas, el otro fue decapitado y tuvo la sangre colectada para análisis de citoquinas, proteínas Heat shock 70 (HSP70), óxido nítrico (NO), volemia y glucemia y un tercer grupo fue utilizado para evaluar la absorción de la curcumina, por HPLC. Para los estudios *in vitro* fue realizada la cultura de macrófagos peritoneales tratados con DS17 y estimulados con LPS por 24 horas. Nuestros resultados mostraron que la DS17 ejerció actividad biológica cuando disminuyó las concentraciones de IL 6 y IL 10 tanto en el plasma cuanto en el lavado peritoneal 6 y 24 horas después la sepsis, pero aumentó las concentraciones plasmáticas de IL 6, 4 horas después la sepsis. Adicionalmente mejoró la hiperglucemia de la fase aguda y hipovolemia de la fase tardía de la sepsis. En las concentraciones de IL 10 plasmáticas y HSP 70 sérica disminuirán en el periodo de 24 horas, mientras el NO plasmático y la glucemia aumentaron en ese mismo periodo. La análisis de la absorción de la curcumina mostró que ella está presente en el plasma 4 a 6 horas más después 24 horas después a la última administración de DS17. Esas alteraciones no fueron suficientes para modificarle significativamente a la sobrevivencia, mientras tanto teníamos observado puntualmente una aparente mejora biológica de un 20% en las 24 horas. El tratamiento de la cultura de los macrófagos con DS17 disminuyó la producción de NO que se siguió a la aplicación de LPS mostrándonos así su acción antioxidante *in vitro*. Nuestros resultados sugieren que a pesar de los efectos oxidante de la DS17 en el modelo *in vivo* de la sepsis experimental, la misma fue capaz de mejorar los parámetros metabólicos y alterar la producción de citoquinas pró y antiinflamatorias durante la fase aguda y tardía de la sepsis. Mientras más estudios son necesarios para esclarecerse el propuesto efecto antiinflamatorio y oxidante de la curcumina durante la sepsis experimental.

Palabras llaves: sepsis, CLP, curcumina, dispersión sólida, citoquinas, metabólico, antioxidante.

INTRODUÇÃO

1. Sepses

1.1. Epidemiologia da sepses

Sepses é uma condição potencialmente fatal que ocorre quando o corpo em resposta a uma infecção danifica seus próprios tecidos e órgãos. Esta síndrome ou doença pode causar choque séptico, falência de múltiplos órgãos e morte, principalmente se não reconhecida precocemente e tratada de imediato (Bone, Grodzin et al. 1997; Levy, Fink et al. 2003; Gonsalves and Sakr 2010). É uma enfermidade complexa, que pode afetar diversos grupos de pacientes, sendo desencadeada pela ação de diferentes microorganismos como vírus, fungos e principalmente bactérias gram-negativas e/ou gram-positivas (Vincent and Korkut 2008).

A sepses é uma das principais doenças tratadas nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), além de ser uma das principais causas de morte não coronariana. Pacientes sépticos ficam internados por muito tempo, possuem uma alta taxa de mortalidade além de gerarem custo alto com o tratamento que nem sempre é suficiente para salvar a vida do paciente (Strassl 2010). Um estudo realizado em 2006 em 22 países europeus e incluindo Israel observou que a taxa de mortalidade em pacientes com sepses em hospitais foi de 24,1%. Mais de 35% dos pacientes tinham ou desenvolveram sepses durante sua estada na UTI, os quais 27% morreram da doença, aumentando para 32% e 54% as mortes por sepses grave e choque séptico (Vincent, Sakr et al. 2006).

Além de a sepses ser um importante problema de saúde global e a causa cada vez mais comum de morbi-mortalidades em UTIs, acomete particularmente idosos (acima de 65 anos), crianças recém-nascidas e de até um ano de idade, imunocomprometidos e pacientes criticamente doentes. Esta doença continua sendo a principal causa de morte por infecção mesmo com os avanços da medicina moderna, incluindo vacinas, antibióticos e cuidados intensivos. Esses avanços levam a um aumento progressivo na idade da população o que contribui para a elevação da incidência da doença (Angus, Linde-Zwirble et al. 2001; Jean-Louis Vincent, Jordi Rello et al. 2009; Gonsalves and Sakr 2010).

Apesar de a sepses ser uma doença de grande importância em nosso meio, dados consistentes sobre a sua incidência nas UTIs do Brasil, somente mais

recentemente começaram a ser conhecidos, tendo sido relatada a ocorrência de cerca de 400 mil novos casos por ano (Silva 2006). Um estudo realizado no Hospital Universitário de Londrina mostrou que o diagnóstico mais frequente nas UTIs era de sepse e suas complicações que atingiam cerca de 40% de casos e as taxas de mortalidade variavam de 32,8% em pacientes com sepse, 49,9% em pacientes com sepse severa e 72,7% em pacientes com choque séptico (Kauss, Grion et al. 2010).

Em 2012, foi realizado um estudo prospectivo com pacientes maiores de 18 anos, internados na UTI do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com diagnóstico de sepse no momento de admissão na UTI. Para avaliar o perfil dos pacientes com sepse, foram coletados dados de identificação, escores do Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) que é um sistema de classificação da severidade da doença e usa princípios fisiológicos básicos para estratificar pacientes com doenças agudas e com risco de morte (Knaus, Draper et al. 1985) e do Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) que é um sistema de pontuação que avalia a extensão da disfunção de órgãos do paciente em UTI. Estes escores são bastante utilizados na prática para prever as probabilidades de sobrevivência de pacientes sépticos (Acharya, Pradhan et al. 2007; Strassl 2010). Avaliaram também o tempo de internação (TI) e a dependência de ventilação mecânica (VM) a partir do prontuário. (Pasinato, Berbigier et al. 2013).

Foi acompanhada a evolução desses pacientes para sepse grave, choque séptico e óbito e foi observado a predominância de sepse em pessoas do sexo masculino e idosos, com média de idade de $63,4 \pm 15,1$ anos. O tempo de internação variou de 8 a 18 dias e os escores prognósticos (SOFA e APACHE II) eram elevados, indicando pacientes criticamente doentes. A taxa de mortalidade observada foi de 39,1% e a maioria dos pacientes com sepse grave apresentaram falência renal aguda. Além disso, 40,2% dos pacientes apresentaram foco infeccioso de origem respiratório e 56,5% apresentaram choque séptico (Pasinato, Berbigier et al. 2013).

A idade elevada dos pacientes admitidos no estudo foi semelhante às observadas em outras regiões do país e no mundo. Os idosos adoecem mais e tem mais riscos de apresentar doenças graves devido à decadência do seu sistema imunológico e, portanto são os maiores frequentadores de UTIs. A infecção respiratória foi a maioria dos casos de sepse, reflexo da idade avançada da população que apresenta maior risco de desenvolver doenças respiratórias. A

maioria das internações em UTIs estava associada a problemas clínicos e a presença elevada de co-morbidades como a hipertensão arterial, o diabetes e o câncer. Estas associações certamente refletem a maior susceptibilidade da população com doenças crônicas em desenvolver complicações graves e ficarem mais tempo internadas. A maioria dos pacientes internados apresentava choque séptico e isto está associado ao aumento da mortalidade, constituindo a principal causa de morte em UTIs (Koury, Lacerda et al. 2006; Pasinato, Berbigier et al. 2013).

De acordo com relatório divulgado em 2012 pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), no Brasil a taxa de mortalidade chega a 61,5% em hospitais públicos, sendo que 48,9% morrem de sepse grave e 73,8% de choque séptico. Estes índices são bem mais elevados que os dados mundiais aonde a mortalidade chega a 30,8% (ILAS 2012). A taxa de morbi-mortalidade em pacientes sépticos é considerada extremamente elevada e isso pode ser atribuído ao fato da doença ter uma patologia bastante complexa, normalmente ser tardiamente diagnosticada e muitas vezes ser tratada inapropriadamente (Poli-de-Figueiredo, Garrido et al. 2008).

O *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* (BASES) nos fornece dados importantes sobre as características de pacientes com sepse nas UTIs de várias regiões do país e enfatiza, porém, que o Brasil é um país de dimensões continentais e com uma população heterogênea sendo então necessário avaliar o perfil epidemiológico dos pacientes de cada região, para definir prioridades de intervenção com a intenção de melhorar o atendimento a esse grupo de pacientes (Koury, Lacerda et al. 2006).

A campanha sobrevivendo à sepse desenvolveu guias para orientação dos profissionais de saúde sobre como diagnosticar e tratar pacientes com sepse, de acordo com as terapias existentes, na tentativa de diminuir a mortalidade nos hospitais. Estudos recentes mostraram que a taxa de mortalidade diminuiu de 37% para 30,8% em 2 anos nos hospitais participantes da campanha, comprovando assim, que a mesma melhorou os cuidados relacionados a sepse ao promover a implementação dos pacotes de tratamento e melhorar o conhecimento dos profissionais da saúde sobre a doença (Dellinger, Levy et al. 2008; Levy, Dellinger et al. 2010; Dellinger, Levy et al. 2013).

1.2. Definições de sepse

A grande quantidade de termos sinônimos para designar a mesma condição clínica levou a muitos inconvenientes para a uniformização de condutas médicas, por isso em 1991 foi realizado uma Conferência de Consenso entre a *Critical Care Medicine Society* e *American College of Chest Physicians*, cujo objetivo era estabelecer definições que poderiam ser aplicadas a pacientes com sepse e com isso conseguir um diagnóstico precoce e permitir uma intervenção terapêutica rápida e eficiente (Bone, Sprung et al. 1992).

Foi proposta a definição de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (do inglês, *SIRS*) para descrever um processo inflamatório independente da causa (infeccioso ou não) e seguido de um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: temperatura corporal maior que 38°C ou menor que 36°C, frequência cardíaca maior que 90 batimentos por minuto, taquipnéia (frequência respiratória maior que 20 movimentos por minuto) ou hiperventilação (PaCO_2 menor que 32 mmHg), leucocitose (>12000 células/ mm^3), leucopenia (<4000 células/ mm^3) ou presença de mais de 10% de células jovens na circulação. Entretanto essas condições clínicas não são específicas e podem designar uma variedade de doenças (Vincent and Korkut 2008; Bone, Balk et al. 2009).

Nessa conferência ficou definido que a sepse é *SIRS* causada por um processo infeccioso confirmado, seja ele provocado por vírus, bactérias, fungos ou parasitas que são capazes de invadir o hospedeiro e causar uma resposta inflamatória sistêmica. Foi definido também conceitos para a progressão da sepse. A sepse grave ficou definida como sepse associada à disfunção orgânica, hipotensão ou hipoperfusão. O choque séptico é uma sepse grave seguida de hipotensão arterial persistente não responsiva à reposição volêmica, necessitando de drogas vasopressoras para restabelecer a pressão arterial e com a presença de hipoperfusão com disfunção de no mínimo um órgão. Quando essa disfunção afeta mais órgãos é chamada Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (do inglês, *MODS*). Porém essas definições foram criticadas pelos médicos intensivistas por serem muito sensíveis e pouco específicas limitando o uso clínico (Bone, Sprung et al. 1992; Vincent and Korkut 2008).

Então, com os avanços do entendimento da fisiopatologia da sepse, presença de novos biomarcadores e a insatisfação com os conceitos estabelecidos na

conferência de 1991, foi realizada uma nova conferência em 2001, para rever esses conceitos, onde participaram a *Critical Care Medicine Society*, *American College of Chest Physicians*, *European Society of Intensive Care Medicine*, *American Thoracic Society* e *Surgical Infection Society*. Os participantes da conferência sugeriram que expansão na lista de sinais e sintomas da sepse poderia refletir numa reposta clínica melhor à infecção. Mas é importante enfatizar que nenhum dos sinais e sintomas são específicos para sepse (Levy, Fink et al. 2003).

Mesmo diante das definições revisadas nestas conferências, o grupo reunido percebeu que os mesmos não permitiam uma caracterização e nem o estágio preciso dos pacientes em condições sépticas, então eles estabeleceram o sistema “PIRO” que classifica o paciente de acordo com sua condição de *Predisposição*, natureza e extensão da *Infecção*, Natureza e magnitude da *Resposta* do hospedeiro e o grau de disfunção de *Órgãos* (Levy, Fink et al. 2003; Vincent and Korkut 2008).

Com essas definições percebemos que a sepse possui vários estágios e precisa ser diagnosticada precocemente para garantir um melhor prognóstico, se não tratada pode evoluir para sepse grave. A sepse grave pode evoluir para choque séptico que pode levar a síndrome da falência de múltiplos órgãos, levando o paciente a óbito (Bone, Sprung et al. 1992; Levy, Fink et al. 2003; Dellinger, Levy et al. 2008). Interessantemente, a despeito da hipotensão progressiva que ocorre em um pacientes que evolui de sepse para choque séptico, a secreção do hormônio vasopressina (AVP) nesta fase se encontra em níveis basais. Isto tem intrigado os pesquisadores, pois a hipotensão além da hipovolemia, hipoglicemia e hipernatremia é conhecidamente um dos estímulos causadores da secreção de AVP. Este hormônio na forma de droga tem sido usado para restabelecer a pressão arterial durante choque séptico, mas os resultados, ainda são contraditórios, em alguns casos, mostrando aumento e em outros uma diminuição da sobrevivência (Dellinger, Levy et al. 2008). Estudos sugerem que o tratamento com AVP pode ser benéfico quando realizado nas fases iniciais da sepse, mas na fase tardia pode ser mais seguro e efetivo sua administração com norepinefrina (NE) (Kampmeier, Rehberg et al. 2010). Tem sido sugerido o uso da NE e da dopamina (DA) como agentes vasopressores de escolha para corrigir a hipotensão em pacientes com choque séptico (Hollenberg 2011).

1.3. Fisiopatologia da sepse

Nas fases iniciais ou na fase hiperreativa da sepse, a excessiva ativação dos PAMPS (Pathogen-associated molecular patterns) e a liberação de mediadores inflamatórios levam a várias disfunções sistêmicas no organismo. As células imunes expressam receptores na superfície de suas membranas chamados receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e entre eles estão os Toll- Like receptores (TLRs) que são capazes de desencadear uma reação de defesa do organismo, logo após uma lesão tecidual ou uma infecção bacteriana (Chen and Zhang 2011).

O endotélio vascular é ativado durante o processo infeccioso e é capaz de aumentar ou limitar a entrada e a saída de substâncias do vaso pela secreção ou metabolização de muitas moléculas ativas na regulação do tônus vascular, coagulação e permeabilidade (renina, endotelina, prostaciclina, óxido nítrico (NO), aminas ativas e etc) (Pereira Junior, Marson et al. 1998).

Ocorre também ativação do sistema imune inato e a primeira linha de defesa é realizada pelas células fagocitárias (macrófagos, monócitos e granulócitos polimorfonucleares). Monócitos são fagócitos mononucleares que circulam no sangue. Durante um processo inflamatório eles aderem ao endotélio e migram para o tecido onde são diferenciados em macrófagos. Monócitos e macrófagos possuem um papel importante tanto na imunidade inata quanto adaptativa. Eles são responsáveis por ingerir microorganismos por meio da fagocitose, produzir mediadores pró e anti-inflamatórios e agem adicionalmente como células apresentadoras de antígenos para induzir a ativação de células T (Muller-Redetzky, Suttorp et al. 2012).

Logo após a ativação do sistema imune inato, ativa-se o sistema imune adaptativo com a ação das imunoglobulinas e das células imunocompetentes que iniciam uma resposta mais específica. Os ativadores da resposta no hospedeiro são os componentes da parede bacteriana (lipopolissacarídeo- LPS de bactérias gram-negativas e ácido teicóico de bactérias gram-positivas), além de estruturas virais, fúngicas e de protozoários. Os TLRs reconhecem seletivamente essas estruturas e componentes e ativam uma cascata dentro da célula imune que provoca a translocação do NFkB (fator de transcrição nuclear kappa B) e ativação da MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) culminando na expressão de genes envolvidos na resposta antimicrobiana do hospedeiro como a liberação de citocinas e radicais

livres (superóxidos, peroxidases, etc). Ao mesmo tempo em que ocorre essa ativação, os patógenos presentes no foco da infecção são fagocitados. Essas propriedades fagocíticas e bactericidas são essenciais para a defesa normal do organismo, mas quando a ativação desses macrófagos se torna descontrolada pode ocorrer uma reação inflamatória generalizada ou hiper-inflamatória (Chen and Zhang 2011; Pasinato, Berbigier et al. 2013).

Na sepse também pode ocorrer uma fase imunossupressiva ou a “Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória”, também chamada de CARS, que sempre segue a fase hiper-inflamatória, especialmente em pacientes que desenvolvem a sepse severa. Nessa fase ocorre a diminuição das vias de sinalização dos neutrófilos e a rápida apoptose de linfócitos e células dendríticas além da produção de citocinas antiinflamatórias. Os pacientes sépticos ficam suscetíveis às infecções hospitalares e a maioria não resiste à doença (Dejager, Pinheiro et al. 2011; Faix 2013).

1.4. Citocinas e alterações metabólicas na sepse

A ativação dos receptores celulares pelos patógenos gera uma cascata de sinalização intracelular com a ocorrência de quinases no citoplasma das células para ativar o fator de transcrição nuclear NFkB, resultando em uma cascata inflamatória mediada pela liberação de citocinas (Chen and Zhang 2011).

Essas citocinas são os elementos chave na resposta inflamatória que caracteriza a sepse e que é regulada por um elaborado sistema de ligação entre mediadores pró e antiinflamatórios. Elas são produzidas por monócitos, linfócitos, neutrófilos e também por outros tipos celulares. No encéfalo essas citocinas são também produzidas por neurônios, astrócitos e microglia (Ramnath, Weing et al. 2006).

Os mediadores pró-inflamatórios facilitam a inflamação pela promoção da adesão endotelial por leucócitos, induzindo a liberação de ácido araquidônico, metabólitos e ativação do complemento, além de promover a coagulação pelo aumento da produção de coagulantes de membrana e fatores teciduais. A SIRS é o resultado de uma resposta pró-inflamatória excessiva. Em contraste, as citocinas antiinflamatórias inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentam a síntese das proteínas de fase aguda e imunoglobulinas além de diminuir a função

dos linfócitos T e macrófagos, inibindo a inflamação (Ramnath, Weing et al. 2006; Faix 2013).

Na fase aguda da sepse, o sistema imune encontra-se hiperativo, o que leva a um aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF α), e interleucina 1 beta (IL-1 β), que são pirógenos endógenos que a longo prazo podem contribuir para o choque séptico e a falência múltipla de órgãos. Também está sendo produzida a interleucina 6 (IL-6) que pode ser chamada de fator estimulador de hepatócito (HSF), por atuar no fígado e estimular a produção de reagentes de fase aguda. Ela possui ação pleiotrópica podendo atuar como pró-inflamatória e anti-inflamatória (Woloski, Smith et al. 1985; Kopf, Baumann et al. 1994; Kishimoto 2010). No soro e lavado peritoneal de ratos nos períodos de 3 e 6 horas após indução da sepse por CLP, foi visto um aumento significativo de IL-1 β e IL-6. Já o aumento de TNF α foi verificado ocorrer apenas 3 horas após a cirurgia tanto no soro como no lavado (Figueiredo, Soares et al. 2012).

A exarcebada produção de citocinas pró-inflamatórias e NO nas fases iniciais da sepse são importantes na ativação das células imunes e no aumento da clearance bacteriano, mas também podem ser responsáveis pelas complicações como hipotensão e falência de órgãos, além de provocar alterações metabólicas (Kumar, Thota et al. 1996; Wei, Shan et al. 2013).

Nas fases mais tardias da sepse, a resposta inflamatória exarcebada é contrabalanceada com a produção de citocinas anti-inflamatórias entre elas a IL-10, que pode resultar em um profundo estado de imunossupressão devido à diminuição da função dos macrófagos efetores (Howard, O'Garra et al. 1992; Hotchkiss, Monneret et al. 2013).

A IL-10 foi descoberta em 1989 por Fiorentino e colaboradores (Fiorentino, Bond et al. 1989), e foi visto que a mesma tem a habilidade de suprimir a produção de citocinas por células Th-1 (IL-6, IL-1, IL-4, IL-5 e etc). Esta citocina é produzida por várias subpopulações de células T, como Th 2, células T regulatórias (T regs), células natural killers (NK cells) e uma variedade de tipos celulares incluindo macrófagos, células dendríticas e células B (Sabat 2010). Como vários outros mediadores, a IL-10 pode exercer efeitos biológicos em diferentes tipos de células além de também ser produzida por macrófagos e células B. Entre suas funções imunossupressivas além da inibição da produção de citocinas por Th-1, está a inibição da função de macrófagos apresentadores de antígeno possivelmente devido

à diminuição da expressão de MHC classe II. Além disso, ela inibe a produção de espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos e a função fagocítica dos macrófagos, impedindo a morte intra e extracelular de parasitas (Fiorentino, Zlotnik et al. 1991; Howard, O'Garra et al. 1992; Hedrich and Bream 2010). Apesar de seu efeito imunossupressor nos macrófagos essa citocina pode exercer atividade imunostimulatória em células B, aumentando sua viabilidade e proliferação e a secreção de imunoglobulinas (Fiorentino, Zlotnik et al. 1991; Hedrich and Bream 2010).

Uma das alterações metabólicas encontradas na sepse é a hiperglicemia causada pela glicólise muscular, lipólise e subsequente gliconeogênese e glicogenólise hepática que ocorrem devido ao aumento da liberação de catecolaminas na fase hipermetabólica da sepse (Norbury, Jeschke et al. 2007).

Sendo assim a hiperglicemia e a resistência insulínica ocorrem durante a sepse como consequência a efeitos metabólicos do estresse hormonal e da produção de citocinas nas fases iniciais da doença. As mudanças na captação e oxidação de glicose em todo o corpo durante a sepse são complexas e dependem do estágio da doença. A glicose está aumentada na fase inicial, com o desenvolvimento da resistência insulínica e liberação de vários hormônios estressores e diminui na fase tardia, quando ocorre a fase hipometabólica (Marik and Raghavan 2004).

Além do mais, a destruição local do endotélio que ocorre devido à aderência de células imunológicas ativas, causa um aumento da permeabilidade e um edema tecidual, com consequente hipovolemia (aumento do hematócrito) durante esse processo e isso contribui para a ampliação a resposta inflamatória (Acharya, Pradhan et al. 2007).

Devido à alta mortalidade em pacientes sépticos frente aos tratamentos padrões, vários esforços vêm sendo feitos para tentar compreender a desregulação da resposta imune do hospedeiro durante a sepse. Como resultado, várias descobertas vêm sendo feitas sobre a interação microorganismo hospedeiro e novas intervenções terapêuticas têm sido reveladas (Jurenka 2009).

1.5. Modelos experimentais

Há controvérsias no que diz respeito à adaptação de dados experimentais para ensaios clínicos. Modelos animais fornecem subsídios importantes sobre o

processo séptico, entretanto não representa fidedignidade ao episódio típico de sepse clínica em humanos. Apesar dessas limitações, eles são essenciais no desenvolvimento de novas terapias para sepse e choque séptico (Poli-de-Figueiredo, Garrido et al. 2008).

Apesar da dificuldade em se reproduzir a sepse em animais, diferentes modelos vem sendo desenvolvidos. Dentre eles está a administração de toxinas exógenas como lipopolissacarídeo (LPS), administração de patógenos viáveis como, vírus e bactérias, modelo de pneumonia e modelo de peritonite bacteriana como peritonite com cânula no cólon ascendente (CASP) e ligação e perfuração cecal (CLP) (Strassl 2010).

No modelo de endotoxemia é comum a administração de endotoxina ou LPS sendo um modelo conveniente e reproduzível. Quando administrado em camundongos o aparecimento de sinais clínicos sistêmicos, incluindo a redução da atividade motora, letargia, tremores e piloereção ocorrem de forma rápida e progride rapidamente. Porém a administração de LPS pode não reproduzir com acurácia algumas características da sepse humana, pois além de não reproduzir a sepse polimicrobiana, há um forte e rápido aumento de várias citocinas pró-inflamatórias, em contraste a um aumento mais baixo e mais prolongado de citocinas de pacientes sépticos (Nemzek, Hugunin et al. 2008).

As peritonites e pneumonias são as principais causas de sepse e os modelos tentam mimetizar uma situação típica de pacientes com a doença onde bactérias disseminam constantemente do foco infeccioso e na maioria dos casos esses focos estão localizados nos pulmões e na cavidade abdominal, causando as doenças. A pneumonia experimental é geralmente induzida por *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa* por injeção direta da bactéria no nariz ou na traquéia do animal, que pode gerar uma resposta inflamatória local e até mesmo sistêmica (Strassl 2010). A indução de sepse por pneumonia em modelo animais fornece a base para o desenvolvimento de novas terapias devido a complexa fisiopatologia da doença que envolve a interação entre a grande variedade de fatores de virulência específicos dos patógenos e dos vários fatores individuais do hospedeiro que são influenciados por determinantes genéticos, comorbidades assim como patologias precedentes locais (Muller-Redetzky, Suttorp et al. 2012). Já a peritonite experimental pode ser dividida com CLP e CASP.

O modelo CASP é um modelo polimicrobiano de contaminação fecal endógena. Uma cânula de diâmetro definido é implantada no cólon ascendente para criar uma conexão aberta entre o lúmen intestinal e o abdômen. Este foco séptico leva a uma contínua disseminação de bactérias que gera primeiramente uma peritonite difusa seguida de uma rápida e progressiva infecção sistêmica (Lustig, Bac et al. 2007). CASP é reproduzível e replica várias características importantes de sepse em humanos. Porém esse modelo exige procedimentos mais difíceis que o CLP, a cirurgia é mais complicada e uma técnica cirúrgica inadequada durante a colocação da cânula, pode levar à falta de permeabilidade da mesma e à formação de um abscesso. Além disso, a hemodinâmica associada à CASP ainda não está bem definida, sendo necessário mais pesquisas para que o modelo seja definitivamente aceito no estudo da sepse (Nemzek, Hugunin et al. 2008).

O modelo CLP é caracterizado por um foco infeccioso polimicrobiano dentro da cavidade abdominal, seguido da translocação dessas bactérias para a circulação e o desencadeamento de uma resposta inflamatória sistêmica (Rittirsch, Huber-Lang et al. 2009; Dejager, Pinheiro et al. 2011). Este último modelo apresenta um alto grau de similaridade de progressão com a da sepse em humanos, portanto é considerado o padrão ouro em modelo de sepse e tem fornecido importantes contribuições no conhecimento dos componentes inflamatórios envolvidos na doença além de contribuir para identificação de alvos terapêuticos (Dejager, Pinheiro et al. 2011).

1.6. Óxido Nítrico (NO)

O NO é um radical livre diatômico, produto final do metabolismo da L- arginina para L- citrulina, possui meia vida extremamente curta em sistemas biológicos, dificultando sua detecção e quantificação. Sua produção endógena tem um papel importante na homeostase vascular, neurotransmissão e mecanismo de defesa do hospedeiro (Tsikas 2007).

É produzido no endotélio e em vários outros tipos celulares presentes no organismo, além de ser sintetizado pelas isoformas da óxido nítrico sintase (NOS). Sua produção é importante no controle da pressão e do fluxo sanguíneo. Evidências sugerem que o aumento da produção de NO pode contribuir para a hipotensão e hiporreatividade vascular em pacientes com choque séptico (Kirkeboen and Strand

1999). O NO pode ser um potente oxidante sobre condições específicas e os produtos da sua degradação podem contribuir com os processos de dano celular como a peroxidação lipídica (Moncada, Palmer et al. 1991; Kirkeboen and Strand 1999). Além disso, o NO produzido por macrófagos ativados, pode ter citotoxicidade não específica contra bactérias e fungos. Camundongos que foram infectados com formas promastigotas de *Leishmania major* na pata, foram tratados durante 6 dias com injeções diárias de L-NG-monometil arginina (L-NMMA), inibidor da atividade da NOS, nas lesões formadas. Através da análise histopatológica dos tecidos das patas tratadas, os camundongos tinham 10^4 vezes mais parasitas e suas lesões eram bem maiores quando comparado a animais controle. Esses resultados mostram que o NO tem um papel importante na destruição de protozoários intracelulares nesse modelo animal (Liew, Millott et al. 1990).

Em nosso laboratório, usando o modelo experimental de sepse por CLP foi visto que na fase inicial da sepse ocorre um aumento da secreção de AVP o que não ocorre na fase tardia. Os resultados do uso de aminoguanidina (inibidor específico de NOS induzível - iNOS) 30 minutos antes de induzir sepse experimental em ratos, mostraram reduzir as concentrações de nitrato, abolir a hipotensão e reduzir a secreção de AVP na fase inicial da sepse, embora não chegue a bloquear a secreção desse hormônio. Na fase tardia, entretanto a aminoguanidina parece ser ineficaz porque a alta produção de NO parece ser capaz de bloquear essa secreção, a despeito da hipotensão progressiva (Correa, Pancoto et al. 2007; Pancoto, Correa et al. 2008). Estes resultados mostram a necessidade de se entender os mecanismos que alteram a secreção de AVP e NO durante a doença/síndrome.

1.7. Heat Shock Protein 70 (HSP70)

As proteínas Heat shock (HSPs) parecem também ter uma tarefa durante a sepse. Essas proteínas, presentes em organismos eucariontes e procariontes, foram inicialmente descobertas em 1962, em larva de *Drosophila melanogaster* que foram expostas ao choque térmico (Ritossa 1962). Estudos posteriores identificaram uma grande variedade de tipos, pertencentes à família HSPs, sendo cada tipo identificado de acordo com seu peso molecular. Entre os tipos mais encontrados em estudos está a HSP 70, que é a mais conservada e mais sensível às variações de

temperatura. Porém as HSPs não são estimuladas apenas por estímulos térmicos, mas também por vários estímulos estressores entre eles físicos e químicos (Joly, Wettstein et al. 2010).

Durante a resposta de choque térmico, ocorre a liberação do monômero fator 1 de choque térmico (HSF-1) que é convertido em um trímero no citoplasma. Então o HSF-1 é fosforilado no núcleo e se liga ao gene promotor das HSPs induzindo sua transcrição. As proteínas sintetizadas possuem um papel protetor contra o estresse ambiental (Kwon, Suh et al. 2010).

A proteína HSP 70 parece possuir um papel vital na proteção celular durante a sepse, endotoxemia e síndrome do estresse respiratório agudo. Participa da resposta imune, funciona como reguladora de células sujeitas a estímulos estressores, incluindo inflamação e estresse oxidativo. Seu efeito citoprotetor é atribuído à sua capacidade de estabilizar a estrutura de proteínas através de interações reversíveis, como chaperonas. Estudos realizados em pacientes com sepse grave avaliaram a relação entre HSP 70 e o estresse oxidativo e constataram que os pacientes com pronunciado estresse oxidativo possuem aumento nos níveis séricos de HSP 70 que pode estar relacionado com as consequências e a severidade da doença (Gelain, de Bittencourt Pasquali et al. 2011). Seu polimorfismo genético tem sido associado com o desenvolvimento do choque séptico. Os estímulos causadores de sepse, incluindo infecções virais, bacterianas e parasitárias, aumentam a síntese da proteína “heat shock” que levam à diminuição das funções celulares pró-inflamatórias, que são ativadas durante a doença (Kee, Cheong et al. 2008).

Estudos recentes têm descrito novas funções da proteína HSP 70 dependendo da sua localização intra ou extracelular (Kregel 2002).

A HSP 70 intracelular tem função protetora sendo que o aumento da sua expressão reduz a mortalidade e disfunção de órgãos em sepse. Ela atua como uma chaperona molecular agindo como um supressor de várias proteínas desnaturadas, regulando a apoptose e prevenindo a ativação de células inflamatórias. Chen e colaboradores, 2005, realizaram um estudo utilizando ratos com sepse induzida por CLP previamente estimulados com choque térmico. Antes do estímulo séptico, ratos tiveram a temperatura retal aumentada para 41°C e a mesma foi mantida por 15 minutos para estimular a liberação de HSPs. Frações citosólicas e nucleares do fígado foram isoladas, para avaliar a atividade de ligação nuclear no NFkB e a

produção de HSP 70 por Western Blot. Pôde-se observar que os ratos pré-estimulados tiveram diminuição da atividade do NFkB e aumento da expressão da proteína HSP 70. Isso implica que o aumento da expressão de HSP pode modular a atividade do NFkB através da atenuação da capacidade de migração nuclear do NFkB, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e provocando um efeito citoprotetor (Chen, Kuo et al. 2005)

Por outro lado a HSP 70 extracelular, possui um papel chave na estimulação da resposta imune. Em humanos sua presença no soro está associada a condições de estresse como processos infecciosos bacterianos ou virais. Dessa forma estresse oxidativo, doenças cardiovasculares e fibrose pulmonar têm sido diretamente relacionadas à concentração de HSP 70 no sangue. Apesar dos efeitos de suas funções extracelulares não estarem claramente definidas, ela pode ser considerada mediadora da resposta imunológica por ser capaz de se ligar a receptores Toll like tipos 2 e 4 (TLR2 e TLR4) da superfície das células apresentadoras de antígeno e de uma maneira NFkB dependente e estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias. Pode também funcionar como carreadoras que vão levar peptídeos antigênicos para as células apresentadoras de antígenos, fornecendo uma ligação entre o sistema imune inato e o adaptativo (Joly, Wettstein et al. 2010; Heck, Scholer et al. 2011).

1.8. Curcumina

O uso de plantas medicinais para tratamento de várias doenças esta associada à medicina popular de diversas partes do mundo. Nos últimos anos, vários trabalhos têm investigado o grande potencial terapêutico das plantas medicinais correlacionando suas propriedades botânicas com sua atividade farmacológica. Sendo assim, mais de 13 mil tipos de plantas têm sido estudadas (Dahanukar, Kulkarni et al. 2000).

Pesquisas clínicas e experimentais têm sido realizadas para avaliar terapias convencionais e inovadoras no tratamento da sepse (Muenzer, Davis et al. 2010). Na busca por novos tratamentos, a curcumina presente em uma planta tropical *Curcuma longa L* foi utilizada durante sepse induzida por CLP e foi capaz de atenuar danos teciduais, diminuir a expressão do TNF- α e reduzir a mortalidade em ratos sépticos (Siddiqui, Cui et al. 2006; Thiemermann 2006). Entretanto, mais estudos

são necessários para propor o uso da mesma como uma nova terapia no tratamento da sepse.

A *Curcuma longa* cresce em regiões quentes e chuvosas de países como China, Índia, Indonésia, Jamaica, Peru e Brasil (Jayaprakasha, Jagan Mohan Rao et al. 2002). É uma erva rizomatosa pertencente à família *Zingiberaceae*. Contêm óleos essenciais, óleos graxos e 2-5% de curcuminóides (Began, Goto et al. 2000). Esta planta foi trazida ao Brasil no início da colonização pelos portugueses, porém foram os bandeirantes que disseminaram o seu uso pelo interior do país que aqui recebe o nome de “Açafrão da Terra” (Teixeira 2009). Tradicionalmente, a *Curcuma* tem sido utilizada em alimentos, cosméticos e na medicina. Como uma especiaria, é usada como tempero dos alimentos com sua cor amarela e distinto sabor, e também serve para dar cor a queijos, manteigas e outros alimentos. Na medicina popular, a *Curcuma* tem sido aplicada como preparações terapêuticas ao longo dos séculos em diferentes partes do mundo (Goel, Kunnumakkara et al. 2008). Os principais curcuminóides presentes na *Curcuma* e que lhe confere a cor amarelo alaranjada são: curcumina (77%), demetoxicurcumina (17%) e bisdemetoxicurcumina (Aggarwal, Kumar et al. 2003; Hubbard, Choudhry et al. 2005).

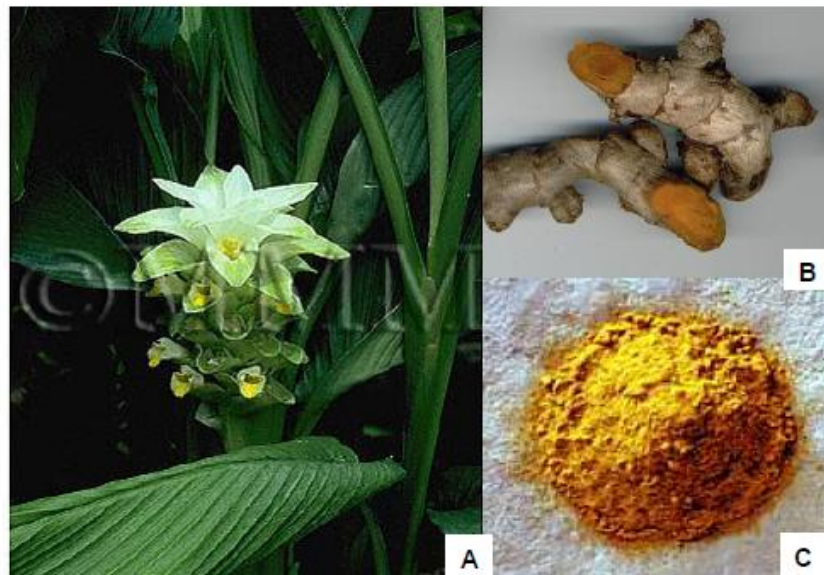


Figura 1. **A.** *Curcuma longa*, planta com flor, **B.** Raíz cortada recentemente, **C.** Pó da raiz. A figura A foi obtida com a permissão do museu de matéria médica do Japão. Figura retirada do artigo (Basnet and Skalko-Basnet 2011).

Entre as principais funções da curcumina estão suas propriedades antiinflamatória, antioxidante e antitumoral. Sendo assim é extremamente importante o estudo dos seus efeitos farmacocinéticos na tentativa de entender suas atividades biológicas. A distribuição tecidual e a eliminação da curcumina, seguida de sua administração oral de 500mg/kg, dissolvida em uma suspensão de óleo de amendoim foram avaliadas em ratos. Em um primeiro grupo de animais o fígado, rins, intestino e plasma foram coletados, depois dos animais serem sacrificados 1h, 3h, 6h, 24h, 2d, 4d e 8d após a administração do composto. Outro grupo de animais teve fezes e urina coletadas 24 horas por 8 dias seguidos durante o tratamento com curcumina. No primeiro grupo foi observado no intestino um pico de concentração de curcumina 1 hora após sua administração, enquanto no sangue, fígado e rim esse pico ocorreu em 6 horas. Além disso, 48,3% da curcumina foi detectada no sangue, fígado rins e intestino 1 a 24 horas após a administração do composto. No outro grupo de animais a principal via de eliminação de curcumina foi fecal sendo que a excreção máxima ocorreu nas primeiras 24 horas (Suresh and Srinivasan 2010).

A atividade antiinflamatória da *Curcuma longa* é atribuída aos grupos fenólicos presentes na estrutura dos curcuminóides e seu princípio ativo é a curcumina. A curcumina foi isolada pela primeira vez por Voguel em 1842. É uma substância insolúvel na água e no éter, mas solúvel em etanol e DMSO. Por ser uma molécula lipofílica ultrapassa rapidamente a membrana celular. Sua estrutura foi descrita por Lampe e Milobedeska em 1910 e quimicamente é um polifenol (diferuloilmetano) com a fórmula: $C_{21}H_{20}O_6$, peso molecular: 368,37; ponto de fusão 179°C a 183°C (Figura 1) (Araujo and Leon 2001).

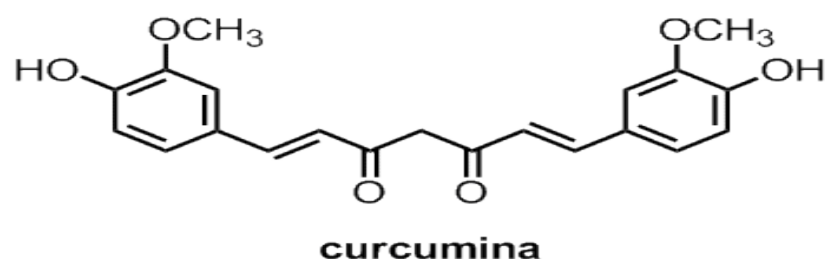


Figura 2- Estrutura química da curcumina

Sua insolubilidade em água dificulta sua aplicação em meio biológicos. Recentemente vários veículos para o aumento da biodisponibilidade da curcumina estão sendo desenvolvidos e testados usando diferentes técnicas de encapsulação

envolvendo nano e micro partículas de caseína, proteína de soja, lipossomo, óleo de milho e etc (Mohanty and Sahoo 2010; Jitoe-Masuda, Fujimoto et al. 2013).

A solubilidade da curcumina em solventes aquosos pode também ser alcançada pela substituição por biomoléculas solúveis em água (Jitoe-Masuda, Fujimoto et al. 2013). Portanto vários análogos à curcumina vêm sendo introduzidos e testados para avaliar suas atividades contra alvos biológicos conhecidos e também para melhorar o perfil farmacológico da curcumina. Ratos com diabetes tipo I foram tratados oralmente por 45 dias com 10mg/kg de um novo derivado de curcumina solúvel em água (NCD, do inglês, *novel curcumin derivate*) (Abdel Aziz, El-Asmar et al. 2012). Os resultados mostraram diminuição nos níveis de glicose em 27,5%, além de diminuição das concentrações de colesterol total e triglicerídeo no sangue e das concentrações de peróxidos lipídicos (malonaldeído) no pâncreas, aorta e fígado. A insulina por sua vez aumentou em 66,6%, nestes animais diabéticos tratados com o composto. Esses resultados confirmam que esta curcumina solúvel em água retém as funções essenciais da curcumina original como a ação antidiabetogênica, além de melhorar o perfil lipídico e o estresse oxidativo diretamente (Abdel Aziz, El-Asmar et al. 2012).

Estudos farmacocinéticos da curcumina em animais mostram que ela exibe baixa absorção gastrointestinal e, portanto baixa biodisponibilidade e é metabolizada formando várias espécies químicas como glucuronídeo de curcumina, sulfato de curcumina, hexahidrocurcumina, tetrahydrocurcumina e dihydrocurcumina (Beevers and Huang 2011).

1.9. Curcumina e sepse

O efeito benéfico da curcumina na sepse parece ser mediado pelo aumento da regulação de receptores ativados de proliferação do peroxissomo (PPAR- γ) que são membros da superfamília de receptores nucleares. O aumento da expressão de PPAR- γ pela curcumina leva à diminuição da liberação de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1, IL6 e ao aumento de mediadores antiinflamatórios, levando ao efeito protetor na sepse e melhorando o quadro infeccioso. Os possíveis mecanismos de ação da curcumina na sepse podem estar associados com a inibição do NFkB e da HSP70 (Siddiqui, Cui et al. 2006).

Outro fato interessante é que a curcumina atenua significativamente a adesão plaquetária e de leucócitos na microcirculação cerebral, e ainda, melhora a sobrevivência de camundongos sépticos (Vachharajani, Wang et al. 2010). Além disso, camundongos que receberam injeções de LPS e foram tratados com curcumina por via intragástrica, antes e depois da endotoxemia, mostraram diminuição do estresse oxidativo através da redução de superóxido, supressão da peroxidação lipídica, da oxidação de proteínas e dos metabolitos de NO urinário (Sompamit, Kukongviriyapan et al. 2009).

A análise histológica do tecido pulmonar de ratos tratados com curcumina nas doses de 50 e 100mg/kg por via intraperitoneal 2 e 12 horas após CLP, mostraram diminuição do edema e da inflamação pulmonar com diminuição da quantidade de neutrófilos e linfócitos infiltrados. A curcumina diminuiu também a atividade da mieloperoxidase (MPO), malondialdeído pulmonar (MDA), um indicador de peroxidação lipídica e também as concentrações de TNF α , IL8 e do fator inibidor de ativação dos macrófagos (MIF) no fluido broncoalveolar. Além disto, 80% a 90% dos animais que receberam curcumina sobreviveram em 72 horas, já 60% dos animais CLP que não receberam tratamento, morreram nesse mesmo período. Esses achados confirmam os efeitos da curcumina na injúria pulmonar aguda induzida por CLP (Xiao, Yang et al. 2012).

Adicionalmente o pré-tratamento com curcumina via oral, possui efeito hepatoprotetor significativo em ratos com sepse induzida por CLP, pois foi capaz de reduzir a liberação de enzimas hepáticas e atenuar a expressão de citocinas pró-inflamatórias através da diminuição da expressão de RNAm para IL-6 e TNF- α no tecido hepático (Seehofer, Schirmeier et al. 2010). Foi observado que o tratamento com curcumina 3 dias antes do estímulo séptico em rato, diminuiu os níveis de TNF α e IL1- β no tecido hepático e isto parece estar associado a um melhor desempenho das funções do órgão (Wu, Cui et al. 2006).

Em outro estudo ratos tiveram sepse induzida por CLP e foram tratados 3 dias com curcumina (200mg/kg/d) por via intraperitoneal e tiveram as funções cardíacas e histopatológicas do miocárdio observadas nos períodos de 24, 48 e 72 horas. A curcumina aumentou a contratilidade e aliviou a o processo inflamatório e o dano estrutural das células do miocárdio do animal séptico, mostrando que ela pode ter um efeito protetor nas funções cardíacas em ratos com sepse experimental (Yang, Su et al. 2013).

Apesar destes estudos, é escasso o número de trabalhos publicados relacionando os efeitos da curcumina na sepse induzida por CLP.

Tendo em vista o grande potencial terapêutico da curcumina e a sua insolubilidade em água, que prejudica sua absorção pelo organismo, um processo fitotecnológico denominado *spray drying* foi desenvolvido, produzindo a dispersão sólida de curcumina 17 (DS17). Esta dispersão apresenta aumento de solubilidade em água, e parece ser mais absorvido pelo trato gastrointestinal. A atividade antiinflamatória desta dispersão foi testada no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) que mostrou diminuir o edema da pata em ratos, quando 100 mg/kg de DS17 foi administrada via oral, 2 horas após a injeção intraplantar de carragenina (Teixeira 2009). Entretanto, o efeito desta dispersão na sepse ainda não foi avaliado, assim como, a associação entre seus efeitos imunológicos e metabólicos durante a sepse.

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da dispersão sólida de curcumina em alterações imunológicas e metabólicas induzidas por sepse experimental.

7. Conclusão

A dispersão sólida de curcumina (DS17) afetou parâmetros metabólicos e imunes durante sepse experimental embora tenha apresentado efeito oxidante *in vivo* e anti-oxidante *in vitro*. Mais estudos são necessários para esclarecer o proposto efeito profilático, antiinflamatório, mas oxidante desta dispersão.

REFERÊNCIAS

Referências

- Abdel Aziz, M. T., M. F. El-Asmar, et al. (2012). "Effect of novel water soluble curcumin derivative on experimental type- 1 diabetes mellitus (short term study)." *Diabetol Metab Syndr* **4**(1): 30.
- Acharya, S. P., B. Pradhan, et al. (2007). "Application of "the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score" in predicting outcome in ICU patients with SIRS." *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* **5**(4): 475-483.
- Aggarwal, B. B., A. Kumar, et al. (2003). "Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies." *Anticancer Res* **23**(1A): 363-398.
- Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, et al. (2001). "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care." *Crit Care Med* **29**(7): 1303-1310.
- Araujo, C. C. and L. L. Leon (2001). "Biological activities of *Curcuma longa* L." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**(5): 723-728.
- Barton, B. E. and J. V. Jackson (1993). "Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model." *Infect Immun* **61**(4): 1496-1499.
- Basnet, P. and N. Skalko-Basnet (2011). "Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment." *Molecules* **16**(6): 4567-4598.
- Beevers, C. S. and S. Huang (2011). "Pharmacological and clinical properties of curcumin." *Botanics: Targets and Therapy* **2011**(1): 5-18.
- Began, G., M. Goto, et al. (2000). "Response surfaces of total oil yield of turmeric (*Curcuma longa*) in supercritical carbon dioxide." *Food Research International* **33**(2000): 341-345.
- Blackwell, T. S. and J. W. Christman (1996). "Sepsis and cytokines: current status." *Br J Anaesth* **77**(1): 110-117.
- Bone, R. C., R. A. Balk, et al. (2009). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992." *Chest* **136**(5 Suppl): e28.
- Bone, R. C., C. J. Grodzin, et al. (1997). "Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process." *Chest* **112**(1): 235-243.
- Bone, R. C., C. L. Sprung, et al. (1992). "Definitions for sepsis and organ failure." *Crit Care Med* **20**(6): 724-726.
- Bozza, F. A., J. I. Salluh, et al. (2007). "Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis." *Crit Care* **11**(2): R49.
- Bryan, N. S. and M. B. Grisham (2007). "Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples." *Free Radic Biol Med* **43**(5): 645-657.
- Buhrmann, C., A. Mobasheri, et al. (2011). "Curcumin modulates nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-mediated inflammation in human tenocytes in vitro: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." *J Biol Chem* **286**(32): 28556-28566.
- Cavaillon, J. M., M. Adib-Conquy, et al. (2003). "Cytokine cascade in sepsis." *Scand J Infect Dis* **35**(9): 535-544.
- Chen, H. W., H. T. Kuo, et al. (2005). "In vivo heat shock protein assembles with septic liver NF-kappaB/I-kappaB complex regulating NF-kappaB activity." *Shock* **24**(3): 232-238.
- Chen, X. H. Y. and J. X. Zhang (2011). "Sepsis and immune response." *World J Emerg Med* **2**(2): 88-92.
- Correa, P. B., J. A. Pancoto, et al. (2007). "Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis." *J Neuroimmunol* **183**(1-2): 17-25.
- Cramer, T., Y. Yamanishi, et al. (2003). "HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation." *Cell* **112**(5): 645-657.

- Dahanukar, S. A., R. A. Kulkarni, et al. (2000). "Pharmacology of Medicinal Plants and Natural Products." *Indian Journal of Pharmacology* **32**: S81-S118.
- Dejager, L., I. Pinheiro, et al. (2011). "Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?" *Trends Microbiol* **19**(4): 198-208.
- Dellinger, R. P., M. M. Levy, et al. (2008). "Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008." *Critical Care Medicine* **36**(1): 296-327.
- Dellinger, R. P., M. M. Levy, et al. (2013). "Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012." *Intensive Care Med* **39**(2): 165-228.
- Doyle, A. and J. B. Griffiths (1999). *Cell and tissue culture : laboratory procedures in biotechnology*. B. Library. England.
- Esper, A. M., M. Moss, et al. (2009). "The effect of diabetes mellitus on organ dysfunction with sepsis: an epidemiological study." *Crit Care* **13**(1): R18.
- Faix, J. D. (2013). "Biomarkers of sepsis." *Crit Rev Clin Lab Sci* **50**(1): 23-36.
- Figueiredo, M. J., D. M. Soares, et al. (2012). "Febrile response induced by cecal ligation and puncture (CLP) in rats: involvement of prostaglandin E2 and cytokines." *Med Microbiol Immunol* **201**(2): 219-229.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond, et al. (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." *J Exp Med* **170**(6): 2081-2095.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, et al. (1991). "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages." *J Immunol* **147**(11): 3815-3822.
- Fujiwara, H., M. Hosokawa, et al. (2008). "Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes." *Diabetes Res Clin Pract* **80**(2): 185-191.
- Gabay, C., C. Lamacchia, et al. (2010). "IL-1 pathways in inflammation and human diseases." *Nat Rev Rheumatol* **6**(4): 232-241.
- Gazzinelli, R. T., I. P. Oswald, et al. (1992). "IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages." *J Immunol* **148**(6): 1792-1796.
- Gelain, D. P., M. A. de Bittencourt Pasquali, et al. (2011). "Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis." *Shock* **35**(5): 466-470.
- Goel, A., A. B. Kunnumakkara, et al. (2008). "Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic." *Biochem Pharmacol* **75**(4): 787-809.
- Gonsalves, M. D. and Y. Sakr (2010). "Early identification of sepsis." *Curr Infect Dis Rep* **12**(5): 329-335.
- Gupta, S. C., S. Prasad, et al. (2011). "Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies." *Nat Prod Rep* **28**(12): 1937-1955.
- Heath, D. D., M. A. Pruitt, et al. (2003). "Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **783**(1): 287-295.
- Heck, T. G., C. M. Scholer, et al. (2011). "HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain?" *Cell Biochem Funct* **29**(3): 215-226.
- Hedrich, C. M. and J. H. Bream (2010). "Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease." *Immunol Res* **47**(1-3): 185-206.
- Hollenberg, S. M. (2011). "Inotrope and vasopressor therapy of septic shock." *Crit Care Nurs Clin North Am* **23**(1): 127-148.
- Hotchkiss, R. S., G. Monneret, et al. (2013). "Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **13**(12): 862-874.
- Howard, M., A. O'Garra, et al. (1992). "Biological properties of interleukin 10." *J Clin Immunol* **12**(4): 239-247.
- Hubbard, W. J., M. Choudhry, et al. (2005). "Cecal ligation and puncture." *Shock* **24** Suppl 1: 52-57.
- ILAS (2012). *Relatório Nacional, Campanha Sobrevivendo a Sepse*, Instituto latino Americano de Sepse.

- Jayaprakasha, G. K., L. Jagan Mohan Rao, et al. (2002). "Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin." J Agric Food Chem **50**(13): 3668-3672.
- Jean-Louis Vincent, Jordi Rello, et al. (2009). "International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units." JAMA **302**(21): 2323-2329.
- Jitoe-Masuda, A., A. Fujimoto, et al. (2013). "Curcumin: from chemistry to chemistry-based functions." Curr Pharm Des **19**(11): 2084-2092.
- Joly, A. L., G. Wettstein, et al. (2010). "Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity." J Innate Immun **2**(3): 238-247.
- Jurenka, J. S. (2009). "Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of Curcuma Longa: A Review of Preclinical and Clinical Research (vol 14, pg 141, 2009)." Alternative Medicine Review **14**(3): 277-277.
- Kampmeier, T. G., S. Rehberg, et al. (2010). "Vasopressin in sepsis and septic shock." Minerva Anesthesiol **76**(10): 844-850.
- Kauss, I. A., C. M. Grion, et al. (2010). "The epidemiology of sepsis in a Brazilian teaching hospital." Braz J Infect Dis **14**(3): 264-270.
- Kee, C., K. Y. Cheong, et al. (2008). "Genetic variation in heat shock protein 70 is associated with septic shock: narrowing the association to a specific haplotype." Int J Immunogenet **35**(6): 465-473.
- Kirkeboen, K. A. and O. A. Strand (1999). "The role of nitric oxide in sepsis--an overview." Acta Anaesthesiol Scand **43**(3): 275-288.
- Kishimoto, T. (2010). "IL-6: from its discovery to clinical applications." Int Immunol **22**(5): 347-352.
- Knaus, W. A., E. A. Draper, et al. (1985). "APACHE II: a severity of disease classification system." Crit Care Med **13**(10): 818-829.
- Kopf, M., H. Baumann, et al. (1994). "Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice." Nature **368**(6469): 339-342.
- Koury, C. A. K., H. R. Lacerda, et al. (2006). "Characteristics of Septic Patients in an Intensive Care Unit of a Tertiary Private Hospital from Recife, northeast of Brazil." Revista Brasileira de Terapia Intensiva **18**(1): 52-58.
- Kregel, K. C. (2002). "Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance." J Appl Physiol **92**(5): 2177-2186.
- Kumar, A., V. Thota, et al. (1996). "Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum." J Exp Med **183**(3): 949-958.
- Kwon, W. Y., G. J. Suh, et al. (2010). "Glutamine attenuates acute lung injury by inhibition of high mobility group box protein-1 expression during sepsis." Br J Nutr **103**(6): 890-898.
- Latifi, S. Q., M. A. O'Riordan, et al. (2002). "Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock." Infect Immun **70**(8): 4441-4446.
- Levy, M. M., R. P. Dellinger, et al. (2010). "The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis." Crit Care Med **38**(2): 367-374.
- Levy, M. M., M. P. Fink, et al. (2003). "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference." Crit Care Med **31**(4): 1250-1256.
- Li, J., Y. Jiang, et al. (2009). "A rapid and simple HPLC method for the determination of curcumin in rat plasma: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study of curcumin liposome." Biomed Chromatogr **23**(11): 1201-1207.
- Liew, F. Y., S. Millott, et al. (1990). "Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine." J Immunol **144**(12): 4794-4797.
- Lustig, M. K., V. H. Bac, et al. (2007). "Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes." Shock **28**(1): 59-64.
- MacMicking, J. D., C. Nathan, et al. (1995). "Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase." Cell **81**(4): 641-650.

- Maitra, S. R., M. M. Wojnar, et al. (2000). "Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis." *Shock* **13**(5): 379-385.
- Malfara, W. R., C. Bertucci, et al. (2007). "Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants." *J Pharm Biomed Anal* **44**(4): 955-962.
- Marik, P. E. and M. Raghavan (2004). "Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis." *Intensive Care Med* **30**(5): 748-756.
- McConnell, K. W., A. C. Fox, et al. (2011). "The role of heat shock protein 70 in mediating age-dependent mortality in sepsis." *J Immunol* **186**(6): 3718-3725.
- Mendonça, L. M. (2012). Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimoterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores in vitro e in vivo , e identificação de alterações na expressão do gene Tp53. *Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto*. Ribeirão Preto, Univesidade de São Paulo.
- Mohanty, C. and S. K. Sahoo (2010). "The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation." *Biomaterials* **31**(25): 6597-6611.
- Moncada, S., R. M. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* **43**(2): 109-142.
- Muenzer, J. T., C. G. Davis, et al. (2010). "Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis." *Infect Immun* **78**(4): 1582-1592.
- Muller-Redetzky, H., N. Suttorp, et al. (2012). Experimental models of pneumonia-induced sepsis. *Drug Discovery Today: Disease Models*. Alemanha. **9**: e-23 -e32.
- Nemzek, J. A., K. M. Hugunin, et al. (2008). "Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being." *Comp Med* **58**(2): 120-128.
- Norbury, W. B., M. G. Jeschke, et al. (2007). "Metabolism modulators in sepsis: propranolol." *Crit Care Med* **35**(9 Suppl): S616-620.
- Oliveira-Pelegrin, G. R., P. J. Basso, et al. (2013). "Cleaved caspase-3 expression in hypothalamic magnocellular neurons may affect vasopressin secretion during experimental polymicrobial sepsis." *J Neuroimmunol* **258**(1-2): 10-16.
- Oliveira-Pelegrin, G. R., M. I. Ravanelli, et al. (2009). "Thermoregulation and vasopressin secretion during polymicrobial sepsis." *Neuroimmunomodulation* **16**(1): 45-53.
- Oliveira-Pelegrin, G. R., R. S. Saia, et al. (2013). "Oxytocin affects nitric oxide and cytokine production by sepsis-sensitized macrophages." *Neuroimmunomodulation* **20**(2): 65-71.
- Osuchowski, M. F., J. Connett, et al. (2009). "Stratification is the key: inflammatory biomarkers accurately direct immunomodulatory therapy in experimental sepsis." *Crit Care Med* **37**(5): 1567-1573.
- Pancoto, J. A. T., P. B. F. Correa, et al. (2008). "Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture." *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical* **138**(1-2): 57-63.
- Pasinato, V. F., M. C. Berbigier, et al. (2013). "Enteral nutritional therapy in septic patients in the intensive care unit: compliance with nutritional guidelines for critically ill patients." *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* **25**(1): 17-24.
- Pereira Junior, G. A., F. Marson, et al. (1998) "PATHOGENETIC MECHANISMS OF SEPSIS AND THEIR THERAPEUTICS IMPLICATIONS." *Simpósio: MEDICINA INTENSIVA: I. INFECÇÃO E CHOQUE* **31**, 349-362.
- Pettila, V., M. Hynninen, et al. (2002). "Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis." *Intensive Care Med* **28**(9): 1220-1225.
- Poli-de-Figueiredo, L. F., A. G. Garrido, et al. (2008). "Experimental models of sepsis and their clinical relevance." *Shock* **30** Suppl 1: 53-59.
- Poylin, V., M. U. Fareed, et al. (2008). "The NF-kappaB inhibitor curcumin blocks sepsis-induced muscle proteolysis." *Mediators Inflamm* **2008**: 317851.
- Ramnath, R. D., S. H. Weing, M., et al. (2006). "Inflammatory mediators in sepsis: Cytokines, chemokines, adhesion molecules and gases." *Journal of Organ Dysfunction* **2**: 80-92.

- Remick, D. G., D. E. Newcomb, et al. (2000). "Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture." Shock **13**(2): 110-116.
- Ritossa, F. (1962). "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*." Experientia **18**(12): 571-573.
- Rittirsch, D., M. S. Huber-Lang, et al. (2009). "Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture." Nat Protoc **4**(1): 31-36.
- Sabat, R. (2010). "IL-10 family of cytokines." Cytokine Growth Factor Rev **21**(5): 315-324.
- Salas, M. A., S. W. Evans, et al. (1990). "Interleukin-6 and ACTH act synergistically to stimulate the release of corticosterone from adrenal gland cells." Clin Exp Immunol **79**(3): 470-473.
- Schottelius, A. J., M. W. Mayo, et al. (1999). "Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding." J Biol Chem **274**(45): 31868-31874.
- Seehofer, D., A. Schirmeier, et al. (2010). "Curcumin attenuates oxidative stress and inflammatory response in the early phase after partial hepatectomy with simultaneous intraabdominal infection in rats." J Surg Res **159**(1): 497-502.
- Siddiqui, A. M., X. Cui, et al. (2006). "The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." Crit Care Med **34**(7): 1874-1882.
- Silva, E. (2006). Sepse: Manual. São Paulo.
- Sompamit, K., U. Kukongviriyapan, et al. (2009). "Curcumin improves vascular function and alleviates oxidative stress in non-lethal lipopolysaccharide-induced endotoxaemia in mice." Eur J Pharmacol **616**(1-3): 192-199.
- Strassl, K. (2010). A Cell Culture Model of Lipopolysaccharide-induced Endothelial Activation. Department for Clinical Medicine & Biotechnology Center for Biomedical Technology. Vienna, Austria, Universität für Bodenkultur: 1-77.
- Suresh, D. and K. Srinivasan (2010). "Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats." Indian J Med Res **131**: 682-691.
- Teiten, M. H., S. Reuter, et al. (2009). "Induction of heat shock response by curcumin in human leukemia cells." Cancer Lett **279**(2): 145-154.
- Teixeira, C. C. C. (2009). Desenvolvimento tecnológico de fitoterápico a partir de rizomas de *Curcuma longa* L. e avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral Medicamentos e Cosméticos. Riberão Preto, Universidade de São Paulo: 164.
- Thiemermann, C. (1997). "Nitric oxide and septic shock." Gen Pharmacol **29**(2): 159-166.
- Thiemermann, C. (2006). "The spice of life: curcumin reduces the mortality associated with experimental sepsis." Crit Care Med **34**(7): 2009-2011.
- Tsai, Y. M., C. F. Chien, et al. (2011). "Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration." Int J Pharm **416**(1): 331-338.
- Tsikas, D. (2007). "Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **851**(1-2): 51-70.
- Vachharajani, V., S. W. Wang, et al. (2010). "Curcumin modulates leukocyte and platelet adhesion in murine sepsis." Microcirculation **17**(6): 407-416.
- Vincent, J. L. and H. A. Korkut (2008). "Defining sepsis." Clin Chest Med **29**(4): 585-590, vii.
- Vincent, J. L., Y. Sakr, et al. (2006). "Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study." Crit Care Med **34**(2): 344-353.
- Wei, Y., L. Shan, et al. (2013). "Protective Effects of Huang-Lian-Jie-Du-Tang against Polymicrobial Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture in Rats." Evid Based Complement Alternat Med **2013**: 909624.
- Woloski, B. M., E. M. Smith, et al. (1985). "Corticotropin-releasing activity of monokines." Science **230**(4729): 1035-1037.
- Wu, R., X. Cui, et al. (2006). "Suppression of hepatocyte CYP1A2 expression by Kupffer cells via AhR pathway: the central role of proinflammatory cytokines." Int J Mol Med **18**(2): 339-346.

- Xiao, X., M. Yang, et al. (2012). "Curcumin protects against sepsis-induced acute lung injury in rats." J Surg Res **176**(1): e31-39.
- Yang, C., X. Su, et al. (2013). "Advances in clinical study of curcumin." Curr Pharm Des **19**(11): 1966-1973.
- Zarkovic, M., S. Ignjatovic, et al. (2008). "Cortisol response to ACTH stimulation correlates with blood interleukin 6 concentration in healthy humans." Eur J Endocrinol **159**(5): 649-652.
- Zengshuan Ma, A. Shayeganpour, et al. (2007). High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin. BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY. **21**: 246-252.