

TALITA AMORIM SANTOS

**EFEITOS DA CURCUMINA EM PARÂMETROS HEPÁTICOS E  
REPRODUTIVOS DE CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS SAUDÁVEIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S237e  
2019 Santos, Talita Amorim, 1989-  
Efeitos da curcumina em parâmetros hepáticos e  
reprodutivos de camundongos swiss fêmeas saudáveis / Talita  
Amorim Santos. – Viçosa, MG, 2019.  
xvi, 68 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Morfologia (Animais). 2. Cúrcuma. 3. Camundongos  
como animais de laboratório. 4. Fígado. 5. Testes de função  
hepática. 6. Fecundidade. 7. Toxicologia - Modelos animais.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Estrutural. II. Título.

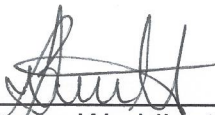
CDD 22. ed. 571.3

TALITA AMORIM SANTOS

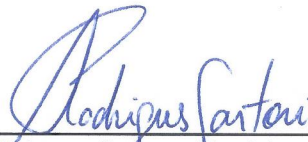
**EFEITOS DA CURCUMINA EM PARÂMETROS HEPÁTICOS E  
REPRODUTIVOS DE CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS SAUDÁVEIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de abril de 2019.



Bruna Waddington de Freitas




Sirlene Souza Rodrigues Sartori



Mônica Moraes Santos



Raquel Alves Costa



Izabel Regina Santos Costa Maldonado  
(Orientadora)

Dedico à

Minha mãe Carmelina que  
sempre foi minha inspiração para  
batalhar e correr atrás dos meus  
objetivos.

Minha irmã Taline que sempre  
me apoiou e me ajudou nos  
momentos mais difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que Ele é pra mim, por ele me permitir chegar até aqui e se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe por ser a mulher mais guerreira e forte que Deus colocou na minha vida. Te amo, minha rainha!

À minha irmã Taline que está ao meu lado desde o ventre da minha mãe. O melhor presente que Deus me deu é ter você como minha irmã gêmea.

À minha família, em especial minha avó Maria do Carmo por sempre lembrar de mim em suas orações, a minhas tias Mirian, Rute e Noédina por todo carinho e apoio de sempre.

Ao meu namorado Cássio pelo carinho, dedicação e cumplicidade.

À minha orientadora Izabel Regina Santos Costa Maldonado por ter aceitado me guiar nessa jornada e pelos ensinamentos durante esses quatro anos. Sou muito grata por ter confiado em mim.

À Lidiane Nascimento por todo o suporte durante a seleção para o doutorado e chegada em Viçosa. Você foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

À Janaina da Silva pela parceria durante todo o desenvolvimento desse trabalho e também por sua amizade, que com certeza é uma das coisas mais preciosas que conquistei em Viçosa.

À minhas grandes amigas e parceiras Renata Passinho e Ianí Cruz por todo incentivo e apoio na minha trajetória acadêmica.

Às meninas da república Cafonas, em especial à Camilla por me proporcionar momentos de conversas tão agradáveis.

Ao Luiz Ladeira pela parceria, pelo auxílio na estatística e no processo de submissão dos trabalhos.

À professora Mariana Machados Neves por toda atenção, carinho e ensinamentos que enriqueceram esse trabalho.

Ao professor Sérgio Luis Pinto da Matta pelo carinho, ensinamentos e por tornar os dias de trabalho no laboratório mais alegres.

Aos estagiários Guilherme, Amanda, Ana Carolina, Ianca e Julia por terem escolhido trabalhar comigo e contribuírem com prazer nesse projeto.

Aos membros do laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, em especial Graziela Domingues, Amanda Lozi, Fernanda Dias e Marcella Sertório, pela ajuda durante todo o período experimental e análises. Sou muito grata pela disponibilidade que cada um teve em me ajudar.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de realização do curso.

À Elizabeth, secretária do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, e ao Gustavo, funcionário do Departamento de Biologia Geral, por serem pessoas tão comprometidas com o trabalho e sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise, ao laboratório de Sistemática Molecular (Beagle) e ao Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros da Universidade Federal de Viçosa por disponibilizarem suas infraestruturas para realização das análises deste trabalho.

Às professoras Raquel Alves, Bruna Waddington, Sirlene Rodrigues e Mônica Moraes pela disponibilidade para compor a banca avaliadora.

À CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa durante o doutorado, a FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. OBJETIVOS .....	8
2.1 Objetivo Geral.....	8
2.2 Objetivos Específicos .....	8
2.2.1 Parâmetros hepáticos e séricos.....	8
2.2.1 Ciclo estral, Ovário e Fertilidade .....	8
3. REFERÊNCIAS .....	9
4. CAPÍTULO 1 .....	14
EFEITO DE ALTAS DOSES DE CURCUMINA NO FÍGADO DE CAMUNDONGAS SAUDÁVEIS.....	14
1. INTRODUÇÃO .....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
2.1 Animais.....	17
2.2 Delineamento experimental.....	17
2.3 Eutanásia, coleta de material biológico e parâmetros biométricos.....	18
2.4 Análises sorológicas.....	18
2.5 Análise de estresse oxidativo/nitrosativo .....	18
2.6. Análise de minerais no fígado .....	19
2.7 Análises histomorfométrica, histopatológica e estereológica .....	20
2.8 Concentração de glicogênio hepático.....	21
2.9 Análise estatística .....	21
3. RESULTADOS .....	21
3.1 Parâmetros biométricos e hepáticos.....	21
3.2 Análises sorológicas.....	22
3.3 Marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo e conteúdo mineral .....	24
3.4 Parâmetros histomorfométricos, estereológicos, e histopatológicos hepáticos....	25
3.5 Concentração de glicogênio hepático.....	28

4. DISCUSSÃO.....	28
5. CONCLUSÃO.....	34
6. REFERÊNCIAS.....	35
5. CAPÍTULO 2.....	42
EFEITOS DA CURCUMINA NOS PARAMETROS REPRODUTIVOS DE CAMUNDONGAS SWISS.....	42
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 Animais.....	45
2.2 Delineamento experimental.....	46
2.3 Experimento 1.....	47
2.4 Experimentos 2 e 3.....	49
2.5 Análise estatística.....	51
3. RESULTADOS.....	51
3.1 Parâmetros biométricos.....	51
3.2 Avaliação do ciclo estral.....	51
3.3 Frequência de folículos ovarianos e corpos lúteos.....	53
3.4 Quantificação de AgNORs em células da granulosa.....	55
3.5 Análise de fertilidade.....	57
4. DISCUSSÃO.....	60
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS.....	64
6. CONCLUSÃO GERAL.....	68

## LISTA DE ABREVIações

ADP	Adenosina difosfato
AgNORs	Regiões argentafins organizadoras de nucléolo
ALP	Alanina fosfatase
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Body Surface Área
CAT	Catalase
CCG	Camadas de células da granulosa
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de carbono
CDNB	2,4 - dinitroclorobenzeno
Cu	Cobre
CUR	Curcumina padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDS	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy
EROs	Espécies reativas do oxigênio
Exp	Experimento
FDA	Food and Drug Administration

Fe	Ferro
GPx	Glutaciona peroxidase
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
GST	Glutaciona S-transferase
GSK-3 $\beta$	Glicogênio Sintase Quinase-3 $\beta$
GS	Glicogênio Sintase
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HDL	Lipoproteína de baixa densidade
HE	Hematoxilina e eosina
IE	Índice de edema
IH	Índice hepatossomático
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Ip	intraperitoneal
LDL	Lipoproteína de alta densidade
LH	Hormônio luteinizante
MDA	Malondialdeído
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NO <sub>3</sub>	Nitrato
PC	Peso corporal
PCF	Peso corporal final

PCI	Peso corporal inicial
PTNc	Proteína carbonilada
Se	Selênio
SOD	Superóxido dismutase
TrxR	Tioredoxina redutase
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
Zn	Zinco
$\gamma$ -GGT	$\gamma$ -glutamiltanspeptidase

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1. Alvos moleculares da curcumina. 2

### CAPÍTULO 1

- Figura 1. Níveis de fosfatase alcalina e transaminases no soro de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. 22
- Figura 2. Parâmetros sorológicos de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. 23
- Figura 3. Atividade das enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo em fígado de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. 24
- Figura 4. Proporção de minerais no fígado de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. 25
- Figura 5. Fotomicrografias representativas de secções histológicas e proporção dos elementos teciduais do fígado de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. 26
- Figura 6. Diâmetro nuclear, parâmetros estereológicos e proporção de hepatócitos mono e binucleados no fígado de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. 27
- Figura 7. Dosagem de glicogênio hepático e fotomicrografias representativas de secções histológicas de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. 28

## **CAPÍTULO 2.**

Figura 1.	Delineamento experimental.	46
Figura 2.	Avaliação do ciclo estral de camundongas nulíparas tratadas com DMSO (veículo) e curcumina.	52
Figura 3.	Estágios do ciclo estral de camundongas nulíparas tratadas com DMSO (veículo) e curcumina.	52
Figura 4.	Total de folículos ovarianos e corpos lúteos de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e curcumina.	53
Figura 5.	Fotomicrografias de secções histológicas de ovário e frequência de folículos ovarianos de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e curcumina.	54
Figura 6.	Frequência de folículos secundários com 2-3 camadas de células da granulosa e frequência folículos secundários com 5 ou mais camadas de células da granulosa de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina.	55
Figura 7.	Fotomicrografia de folículos secundários e média de AgNOR por célula da granulosa de folículo secundário de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina.	56
Figura 8.	Análise de fertilidade de camundongas adultas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina durante 28 dias antes do acasalamento.	58
Figura 9.	Análise de fertilidade de camundongas adultas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina durante o acasalamento e gestação.	59

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1. Parâmetros biométricos de camundongas tratadas com 21 curcumina.

### Capítulo 2.

Tabela 1. Parâmetros biométricos de camundongas nulíparas tratadas com 51 DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina.

Tabela 2. Índices de fertilidade de camundongas adultas tratadas com 57 DMSO e curcumina por 28 dias antes do acasalamento.

Tabela 3. Índices de fertilidade de camundongas adultas tratadas com 57 DMSO e curcumina durante os períodos de acasalamento e gestação.

## RESUMO

SANTOS, Talita Amorim, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2019. **Efeitos da curcumina em parâmetros hepáticos e reprodutivos de camundongos Swiss fêmeas saudáveis.** Orientadora: Izabel Regina Santos Costa Maldonado. Coorientadora: Mariana Machado Neves.

Curcumina é o composto majoritário presente no rizoma de *Curcuma longa L.*, planta pertencente à família do gengibre (Zingiberaceae). Essa molécula é capaz de atuar em diversos alvos moleculares e com isso exercer inúmeras atividades farmacológicas, como antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa. O potencial terapêutico da curcumina no tratamento de diversas patologias tem sido relatado por inúmeros autores. No entanto, algumas pesquisas evidenciam que, a depender da dose utilizada, esse composto pode exercer efeitos indesejáveis ao organismo. Diante disso, este estudo objetivou avaliar o efeito da administração de três doses de curcumina em parâmetros hepáticos e reprodutivos de camundongas saudáveis. Para isso, três experimentos (Exp.1, Exp.2 e Exp.3) foram realizados utilizando camundongos Swiss adultos. Cada experimento foi composto por quatro grupos, sendo estes: grupo veículo, que recebeu 0,2ml de dimetilsulfóxido (DMSO) por animal, e três grupos que receberam curcumina pura natural diluída em DMSO. Os grupos que receberam curcumina consistiram em: grupo CUR-250 que recebeu 250mg/Kg, o grupo CUR-500 que recebeu 500mg/Kg e o grupo CUR-1000 que recebeu 1000mg/Kg de peso corporal. A administração do DMSO ou da curcumina foi feita por via oral. As fêmeas do Exp.1 foram tratadas com DMSO ou curcumina durante 28 dias consecutivos e no 29º dia foram eutanasiadas. Nesses animais foram avaliados o efeito da curcumina no ciclo estral, ovário e fígado. Os Exp.2 e 3 foram realizados para avaliar o efeito da curcumina na fertilidade das camundongas. No Exp.2, as fêmeas receberam o tratamento por 28 dias consecutivos e após vinte e quatro horas do último tratamento, foram colocadas para acasalar e seguir com a gestação. Já as fêmeas do Exp.3 receberam o tratamento durante todo o período de acasalamento e gestação. As fêmeas do Exp.2 e 3 foram eutanasiadas no 19º dia após a confirmação da cópula. No capítulo 1 desse estudo foi avaliado o efeito da curcumina sobre o fígado. Os resultados obtidos evidenciaram que, na dose de 250mg/kg, a curcumina não acarretou em prejuízos a esse órgão. No entanto, os animais que receberam 500 ou

1000mg/kg/PC de curcumina, apresentaram aumento dos níveis dos biomarcadores de função hepática como ALP, ALT e albumina, aumento da glutathione S-transferase, metabólitos do óxido nítrico (nitrito/nitrato) e malondialdeído. Além disso houve alteração na biodisponibilidade de micro minerais como o Se, Zn, Cu e Fe. Também foi observado que o tratamento com curcumina provocou aumento de sinusoides (dose de 1000mg). A partir desses resultados, concluímos que a ingestão contínua de curcumina, embora não seja hepatotóxica em dosagens baixas, numa dosagem, a partir de 500 mg/kg/PC, pode atuar como agente pró-oxidante e provocar danos ao tecido hepático. O efeito da curcumina sobre os parâmetros reprodutivos foram avaliados no segundo capítulo desse estudo. Nossos resultados mostraram que o tratamento com curcumina em camundongas nulíparas levou a irregularidades no ciclo estral e reduziu a atividade proliferativa de células da granulosa de folículos secundários. O desempenho reprodutivo também foi afetado pelo tratamento com a curcumina. Nas fêmeas que receberam 1000mg/kg/PC de curcumina anteriormente ao acasalamento o índice de prenhez foi reduzido em 50%. Já nas fêmeas que receberam curcumina durante o acasalamento e gestação a ação antifertilidade desse composto foi potencializada, pois houve redução significativa no índice de prenhez e aumento de perda pré-implantação em todos os grupos tratados com curcumina. Diante disso, concluímos que em camundongas a curcumina, nas doses testadas, compromete a fertilidade, principalmente quando consumida no período do acasalamento.

## ABSTRACT

SANTOS, Talita Amorim, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2019. **Effects of curcumin on liver and reproductive parameters of healthy female Swiss mice.** Adviser: Izabel Regina Santos Costa Maldonado. Co-Adviser: Mariana Machado Neves.

Curcumin is the major compound present in the rhizome of *Curcuma longa L.*, a plant belonging to the ginger family (Zingiberaceae). This molecule is able to act in diverse molecular targets and with this to exert numerous pharmacological activities, as antioxidants, anti-inflammatory, and anticancer. The therapeutic potential of curcumin in the treatment of several pathologies has been reported by diverse authors. However, some research shows that, depending on the dose used, this compound may exert unwelcome effects on the body. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of administration of three doses of curcumin on hepatic and reproductive parameters of healthy female mice. For this, three experiments (Exp.1, Exp.2 and Exp.3) were performed using Swiss adult mice. Each experiment was composed of four groups: vehicle group, which received 0.2 ml of dimethylsulfoxide (DMSO) per animal, and three groups that received natural pure curcumin diluted in DMSO, in which the CUR-250 group received 250 mg/kg, CUR-500 group received 500mg/kg, and the CUR-1000 group received 1000mg/kg body weight (BW). Administration of DMSO or curcumin was done orally. Females of Exp.1 were treated with DMSO or curcumin for 28 consecutive days and on the 29th day were euthanized. In these animals, the effect of curcumin in the estrous cycle, ovary and liver were evaluated. Exp.2 and 3 were performed to evaluate the effect of curcumin on the fertility of female mice. In Exp.2, the females received the treatment during 28 consecutive days. Twenty-four hours after the last treatment, these animals were placed to mate and continue with gestation. The females of the Exp.3 received the treatment during the entire mating and gestation period. Females of Exp.2 and 3 were euthanized on the 19th day after confirmation of copulation. In Chapter 1 of this study, we discussed the effect of curcumin on the liver. The results obtained showed that, at a dose of 250mg / kg, curcumin did not cause any damage to this organ. However, animals that received 500 or 1000mg / kg / BW of curcumin, showed increased levels of liver function biomarkers such as ALP, ALT

and albumin, increased glutathione S-transferase, metabolites of nitric oxide (nitrite / nitrate) and malondialdehyde. In addition, there was a change in the bioavailability of micro minerals such as Se, Zn, Cu and Fe. It was also observed that the treatment with curcumin caused an increase in sinusoids (1000mg dose). From these results, we conclude that the continuous ingestion of curcumin, although it is not hepatotoxic in low dosages, in a dosage, from 500 mg/kg/BW, can act as a pro-oxidant agent and cause damage to the liver tissue. The effect of curcumin on reproductive parameters was evaluated in the second chapter of this study. Our results showed that treatment with curcumin in nulliparous mice led to irregularities in the estrous cycle and reduced the proliferative activity of granulosa cells from secondary follicles. Reproductive performance was also affected by treatment with curcumin. In females receiving 1000mg/kg/BW of curcumin prior to mating, the pregnancy rate was reduced by 50%. In females receiving curcumin during mating and gestation the antifertility effect of this compound was potentiated, as there was a significant reduction in pregnancy index and increase of pre-implantation loss in all groups treated with curcumin. Therefore, we conclude that in mice, curcumin has a contraceptive effect, especially when consumed during the mating period.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os curcuminóides são polifenóis encontrados no rizoma de *Curcuma longa L.*, uma espécie pertencente à família do gengibre (Zingiberaceae), cultivada em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Índia, China e América Latina (GHOSH *et al.*, 2015). O curcuminóide mais abundante encontrado no rizoma de *Curcuma longa L.* é a curcumina, uma substância de venda livre (*over-the counter*) em todo o mundo (Basnet e Skalko-Basnet, 2011; Codevilla *et al.*, 2015). Além do uso como corante alimentar, a curcumina tem aplicação terapêutica, e para esse fim, ela é comercializada sob a forma de adesivo transdérmico, cápsulas, colírio, cremes, gel e pó (Ministério da Saude, 2015).

A curcumina é solúvel em metanol, etanol, acetona e dimetilsulfóxido (DMSO) (Prasad *et al.*, 2014a). Devido às suas características lipofílicas, a curcumina se difunde através das membranas biológicas, como a membrana plasmática, retículo endoplasmático e envelope nuclear, sendo capaz de provocar mudanças estruturais e funcionais no meio intracelular (Jaruga *et al.*, 1998).

A absorção e distribuição da curcumina no organismo são processos importantes para a sua atividade biológica. Estudos têm demonstrado que a curcumina sofre modificações após a administração oral em animais e que seus metabólitos têm efeito benéfico como antioxidante e anti-inflamatório (Prasad *et al.*, 2014a; Ghosh *et al.*, 2015). No entanto, um dos principais problemas encontrados no uso terapêutico desse composto está relacionado à sua baixa biodisponibilidade, que é principalmente atribuída à sua má absorção, rápido metabolismo e excreção (Burgos-Morón *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 2014b). Apesar disso, a curcumina administrada por via oral em roedores atinge um pico de concentração sérica no intervalo de uma a duas horas após a ingestão (Yang *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2013). A curcumina é detectada em órgãos como ovário, fígado, rins e cólon três horas após sua administração oral (500mg/kg de peso corporal) em ratos (Arozal *et al.*, 2019). No fígado, a curcumina é rapidamente excretada pela bile associada à proteína de resistência a múltiplas drogas 2 (Mrp2), portanto, sua concentração hepática é menor do que a sua concentração plasmática (Lee *et al.*, 2012).

Curcumina é uma molécula altamente pleiotrópica, pois possui capacidade de atuar sobre muitos tipos celulares devido a sua interação e regulação (positiva ou negativa) de vários alvos moleculares (Prasad *et al.*, 2014a). Essa característica permite a interação com ampla variedade de processos, que vão desde a atividade catalítica de enzimas antioxidantes e anti-inflamatórias até a expressão de múltiplos genes relacionados à inflamação e à biologia redox, além de torná-la capaz de atuar sobre muitos tipos celulares (Aggarwal e Sung, 2009; Gupta *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2015). (Figura 1). As ações antioxidante e anti-inflamatória explicam a maioria dos efeitos benéficos da curcumina, pois tanto o estresse oxidativo como a inflamação desempenham papéis importantes na patogênese de várias doenças (Aggarwal e Harikumar, 2009; Hewlings e Kalman, 2017).



**Figura 1.** Alvos moleculares da curcumina. Fonte: Adaptado de Prasad *et al.*, 2014a

Na última década, o potencial terapêutico da curcumina tem sido comprovado no tratamento de doenças como: câncer, doenças pulmonares, neurológicas, hepáticas, metabólicas, auto-imunes e cardiovasculares (Aggarwal e Harikumar, 2009; Prasad *et al.*, 2014a; Ghosh *et al.*, 2015; Hewlings e Kalman, 2017).

Apesar dos numerosos estudos que revelam a segurança e os diversos efeitos benéficos da curcumina, autores têm afirmado que este composto pode causar o contrário. Segundo Burgos-Morón e colaboradores (2010), a curcumina pode causar danos ao DNA tanto *in vitro* como *in vivo*, em concentrações similares às que exercem efeito benéfico (Cao *et al.*, 2006). Em estudos *in vitro*, a curcumina tem sido relatada como um agente pró-oxidante pois, em concentrações elevadas, ela aumenta os níveis celulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de hepatoma (Kang *et al.*, 2005; McNally *et al.*, 2007).

No presente estudo avaliamos o efeito da administração da curcumina no fígado, um dos órgãos do sistema digestório mais importante, pois é responsável por diversas funções essenciais ao organismo, incluindo manutenção da homeostasia (Maronpot *et al.*, 2010). A maioria dessas funções são realizadas pelas células mais numerosas desse órgão, os hepatócitos (Lee *et al.*, 2001), destacando-se: o metabolismo proteico, lipídico e glicídico, armazenamento de vitaminas e metais, a secreção da bile, excreção de bilirrubina e colesterol, biotransformação de substâncias endógenas (hormônios) e xenobióticos (Kuntz e Kuntz, 2008; Soto-Gutierrez *et al.*, 2011). As células de Kupffer são os macrófagos residentes no fígado, estão localizados próximos à parede dos sinusóides hepáticos e sua função primordial é a fagocitose, sendo as primeiras células do sistema fagocítico a terem contato com substâncias antigênicas oriundas do trato gastrointestinal (Vera-Ramirez *et al.*, 2013; Roy-Chowdhury e Roy-Chowdhury, 2014). Além disso, essas células apresentam as funções de pinocitose; remoção de toxinas, antígenos, complexos anticorpo-antígeno e purinas; e também são fontes de substâncias sinalizadoras (p.ex. citocinas e fatores de crescimento) (Kuntz e Kuntz, 2008; Steib e Gerbes, 2010; Roy-Cowdhury e Roy-Chowdhury, 2014). Entre os hepatócitos e os sinusóides situa-se o espaço de Disse, onde se localizam as células estreladas envolvidas no metabolismo e armazenamento de retinoides (Tsung e Geller, 2011; Vera-Ramirez *et al.*, 2013). Após um dano hepático crônico, as células estreladas são ativadas em miofibroblastos, que desempenham um importante papel na fibrose hepática (Kuntz e Kuntz, 2008; Marra *et al.*, 2010).

O fígado possui uma das mais altas atividades de enzimas antioxidantes do corpo e está envolvido na maioria das desintoxicações do organismo. Ele é importante

na degradação e bioativação dos compostos tóxicos ao organismo (Akhgari *et al.*, 2003; Vera-Ramirez *et al.*, 2013). A maioria das enzimas biotransformadoras de xenobióticos do fígado localizam-se nos hepatócitos, dessa forma, essas células são o foco dos sistemas de desintoxicação não só do fígado, mas também de todo o corpo (Akhgari *et al.*, 2003).

A biotransformação dos compostos químicos exógenos é dividida em fase I e fase II. A fase I, ou fase inicial, expõe ou insere grupos polares na substância hidrofóbica, tornando-a em hidrofílica por meio de enzimas envolvidas em reações de oxidação, hidrólise e redução (Kuntz e Kuntz, 2008; Apte e Krishnamurthy, 2011). No entanto, metabólitos produzidos por reações oxidativas na fase I podem gerar espécies reativas do oxigênio (EROs), que são imensamente tóxicas aos hepatócitos (Di Giulio *et al.*, 1989). As EROs podem ser neutralizadas pelo sistema antioxidante enzimático ou não enzimático do fígado e caso tenha um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes hepáticas e a produção de espécies reativas de oxigênio, é possível que haja estresse oxidativo com consequente lesão celular e tecidual (Halliwell e Gutteridge, 2007). Já na fase II, adiciona-se um resíduo hidrofílico no metabólito produzido na fase I por meio de conjugação com uma substância endógena catalisada por transferases específicas. As reações de conjugação incluem glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com aminoácidos e conjugação com glutatona (Kuntz e Kuntz, 2008; Apte e Krishnamurthy, 2011).

O hepatócito é a célula hepática mais susceptível à injúria devido a sua função de absorver e por estar em contato com vários metabólitos, substâncias tóxicas e drogas (Lee *et al.*, 2007). A exposição do hepatócito a concentrações significativas de substâncias exógenas de forma contínua pode levar a lesões nessas células resultando em disfunções hepáticas (Jaeschke, 2012).

A curcumina tem demonstrado efeitos benéficos em diversos modelos experimentais com danos no fígado, principalmente por suas potentes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Esses benefícios incluem: proteção contra lesões e fibrogênese, por meio da supressão da inflamação hepática; diminuição do estresse oxidativo hepático (Mathuria e Verma, 2007); aumento da expressão das enzimas de desintoxicação xenobiótica (Iqbal *et al.*, 2003; Hemeida e Mohafez, 2008; Farghaly e Hussein, 2010) e inibição da ativação das células estreladas hepáticas (Priya e

Sudhakaran, 2008). Além disso, a curcumina também foi relatada por reduzir o armazenamento de lipídios nos hepatócitos de roedores que receberam dieta com alto teor de gordura, o que contribuiu para minimizar o dano no fígado induzido pela disfunção mitocondrial e pelo estresse oxidativo (Vera-Ramirez *et al*, 2013).

No entanto, apesar das suas propriedades benéficas, alguns efeitos negativos da curcumina sobre o fígado têm sido relatados. Deshpande e colaboradores (1998) observaram que a curcumina exerceu efeitos hepatotóxicos em ratos e camundongas saudáveis, pois promoveram alterações no peso absoluto e relativo do fígado; necrose focal e aumento nos níveis séricos das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Os efeitos prejudiciais da curcumina também foram evidenciados por Qiu e colaboradores (2016). Esses autores observaram que a administração de curcumina (100mg/kg de peso corporal), cinco dias por semana e durante 90 dias, causou diminuição do peso corporal de ratos; induziu lesão hepática através da produção de estresse oxidativo; degeneração hidrópica em hepatócitos e aumento de células binucleadas. Também provocou distúrbios inflamatórios e aumentou nos níveis de AST e  $\gamma$ -glutamiltanspeptidase ( $\gamma$ -GGT), o que indicou a presença de lesão hepática e alteração no metabolismo lipídico.

O duplo efeito da curcumina no fígado de camundongos com lesão hepática induzida por etanol foi confirmado por Zhao e colaboradores (2012). A administração por via intraperitoneal de curcumina na dose de  $1 \times 10^{-4}$  M atenuou as lesões causadas pelo etanol. Já a dose de  $1 \times 10^{-3}$  M a curcumina aumentou os níveis de alanina fosfatase (ALP) e AST, a inflamação e a lesão hepática induzido pelo o etanol. Esse trabalho deixa claro que, assim como qualquer outro composto, os efeitos benéficos ou maléficos da curcumina estão diretamente relacionados à concentração administrada.

No presente estudo também avaliamos o efeito da curcumina no ovário e fertilidade de camundongas. As unidades funcionais do ovário são os folículos ovarianos. Estruturalmente, o folículo é formado por um oócito, o gameta feminino, envolvido por uma ou mais camadas de células somáticas denominadas de células foliculares ou células da granulosa, além das células tecais (Sánchez e Smitz, 2012). O oócito e as células da granulosa possuem junções comunicantes que permitem uma comunicação bidirecional. Por meio dessas junções comunicantes e pelo contato

célula-célula na superfície celular, o oócito pode promover o crescimento e a diferenciação das células da granulosa, enquanto essas células asseguram o crescimento e a diferenciação do oócito (Van Den Hurk e Zhao, 2005).

Durante o processo de desenvolvimento, após a puberdade, os folículos podem ser classificados em dois grandes grupos: folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais. Ao longo do desenvolvimento folicular, a interação e a regulação recíproca entre oócito e células da granulosa são responsáveis pela criação de um microambiente único, capaz de oferecer todas as condições para a aquisição da competência e maturação do oócito, eventos necessários para que o oócito adquira capacidade de ser fertilizado e produzir um embrião saudável, capaz de continuar o seu desenvolvimento, culminando com o nascimento de um indivíduo (Eppig, 2001; Matzuk et al., 2002; Sánchez e Smitz, 2012).

Quando o folículo completa seu desenvolvimento, este é denominado folículo maduro (pré-ovulatório ou de Graaf). A partir deste ponto, o oócito envolto pela zona pelúcida e pela *corona radiata* (células da granulosa ao redor do oócito), é expelido do ovário, processo conhecido como ovulação (Sánchez e Smitz, 2012). Após esse processo, as estruturas remanescentes do folículo rompido, composta pelas células da teca e as células da granulosa se reorganizam, funcional e morfológicamente para formarem o corpo lúteo. O corpo lúteo, em humanos, sob o estímulo do hormônio luteinizante (LH) e da gonadotrofina coriônica humana (hCG), produz predominantemente o hormônio progesterona que será necessário para a manutenção da gestação (Salles e Araújo, 2010).

Os efeitos benéficos da curcumina no ovário foram relatados por alguns autores. De acordo com Aktas e colaboradores (2012), o pré-tratamento com curcumina reduziu a atresia folicular em camundongos expostos à radiação ionizante. A ação protetora da curcumina na insuficiência ovariana prematura foi observada em ratos (Melekoglu *et al.*, 2018) e camundongos (Yan *et al.*, 2018), pois reduziu o dano ovariano, melhorando os níveis de marcadores de estresse oxidativo, os níveis de marcadores de reserva ovariana e os parâmetros histopatológicos. Também foi observado efeito protetor da curcumina em ovários de ratos submetidos a isquemia e reperfusão (Eser *et al.*, 2017). Além disso, por meio de mecanismos anti-tumorigênico

e anti-angiogênico a curcumina também apresentou efeitos positivos em modelos de carcinoma ovariano (Lin *et al.*, 2007).

No entanto, alguns autores têm demonstrado que, a depender da dose, a curcumina pode prejudicar parâmetros reprodutivos. Segundo Kádasi e colaboradores (2017), curcumina diminuiu significativamente o acúmulo de marcadores de proliferação e a expressão de seus RNAm em células da granulosa de ovários de porcas. Esses autores também relataram que a curcumina induziu apoptose em células saudáveis do ovário, principalmente através da promoção da transcrição do gene Bax. Chen e Chan (2012) relataram que, *in vitro*, a curcumina inibe a maturação de ovócitos de ratas Wistar e também promove efeitos prejudiciais sobre a fertilização "*in vitro*" e estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Chen e colaboradores (2010) também demonstraram que, *in vitro*, a exposição de blastocisto de ratos à curcumina desencadeia a apoptose de células embrionárias.

Embora os curcuminoides sejam considerados seguros pelas organizações "Food and Drug Administration" (FDA) e "Food and Agriculture Organization of the United Nations" (FAO, 2004) há indícios de que a curcumina pode não ser tão eficaz e segura. Portanto, estudos que avaliem a toxicidade desse composto é de extrema importância para se conhecer o risco-benefício de seu uso.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da administração de três doses crescentes de curcumina sobre o fígado, perfil bioquímico sérico, ciclo estral, ovário e fertilidade de camundongas Swiss adultas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

#### **2.2.1 Parâmetros hepáticos e séricos**

- ✓ Dosar a concentração de proteínas séricas relacionadas a função hepática: ALT, AST, ALP, bilirrubina, albumina e proteínas totais;
- ✓ Dosar a concentração de LDL, HDL, VLDL e triglicerídeos;
- ✓ Determinar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatationa S-transferase (GST) no fígado;
- ✓ Determinar a concentração de metabólitos do óxido nítrico, nitrito (NO<sub>2</sub>) e nitrato (NO<sub>3</sub>), malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada no fígado;
- ✓ Determinar a proporção de minerais no fígado: Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Magnésio (Mg), Selênio (Se) e Zinco (Zn);
- ✓ Identificar alterações histopatológicas no tecido hepático.

#### **2.2.1 Ciclo estral, Ovário e Fertilidade**

- ✓ Identificar alterações na duração total e de cada fase do ciclo estral de camundongas nulíparas;
- ✓ Determinar a frequência de folículos ovarianos e corpos lúteos em camundongas nulíparas;
- ✓ Avaliar o potencial proliferativo de células da granulosa de folículos com duas a três camadas e de folículos com cinco ou mais camadas através da quantificação de Regiões Argentafins Organizadoras de Nucléolo (AgNORs) presentes no núcleo dessas células.
- ✓ Avaliar o efeito do pré-tratamento com curcumina no desempenho reprodutivo de camundongas fêmeas;
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com curcumina durante o período de acasalamento e gestação no desempenho reprodutivo de camundongas.

### 3. REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41(1), p.40–59, 2009.
- AGGARWAL, B. B.; SUNG, B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.30(2), p.85–94, 2009.
- AKHGARI, M.; ABDOLLAHI, M.; KEBRYAEZADEH, A.; HOSSEINI, R.; SABZEVARI, O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. **Human Experimental Toxicology**, v.22(4), p.205-211, 2003.
- AKTAS, C.; KANTER, M.; KOCAK, Z. Antiapoptotic and proliferative activity of curcumin on ovarian follicles in mice exposed to whole body ionizing radiation. **Toxicology and industrial health**, v.28(9), p. 852-863, 2012.
- APTE, U.; KRISHNAMURTHY, P. Chapter 11: Detoxification Functions of the Liver. In: MONGA, S.P.S. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. New York: Springer, 2011.
- AROZAL, W.; RAMADANTY, W. T.; LOUISA, M.; SATYANA, R. P. S.; HARTONO, G.; FATRIN, S.; PURBADI, S.; ESTUNINGTYAS, A.; INSTIATY, I. Pharmacokinetic Profile of Curcumin and Nanocurcumin in Plasma, Ovary, and Other Tissues. **Drug Research**, e-0863-4355, 2019.
- BASNET, P.; SKALKO-BASNET, N. Curcumin: An Anti-Inflammatory Molecule from a Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. **Molecules**, v.16(6), p.4567-4598, 2011.
- BURGOS-MORÓN, E.; CALDERÓN-MONTAÑO, J. M.; SALVADOR, J.; ROBLES, A.; LÓPEZ-LÁZARO, M. The dark side of curcumin. **Internation Jornal of Cancer**, v.126(7), p.1771–1775, 2010.
- CAO, J.; JIA, L.; ZHOU, H. M.; LIU, Y.; ZHONG, L. F. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells. **Toxicological Sciences**. v.91(2), p.476–83, 2006.
- CHANG, M. T.; TSAI, T. R.; LEE, C. Y.; WEI, Y. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, C. R.; TZEN, J. T. Elevating bioavailability of curcumin via encapsulation with a novel formulation of artificial oil bodies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61(40), p.9666–9671, 2013.
- CHEN, C. C.; HSIEH, M. S.; HSUW, Y. D.; HUANG, F. J.; CHAN, W. H. Hazardous effects of curcumin on mouse embryonic development through a mitochondria-

dependent apoptotic signaling pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, 11(8):2839–55, 2010.

CODEVILLA, C. F.; BARIN, J. S.; SILVA, C. B.; SILVA, T. M.; MENEZES, C. R. Incorporação da curcumina em sistemas nanoestruturados: Revisão. *Ciencia e Natureza*. **Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos**, v.37(Ed Especial), p.152–163, 2015.

DESHPANDE S. S.; INGLE, A. D.; RASTE, A. S.; GADRE, S. G.; MARU, G. B. Subchronic oral toxicity of turmeric and ethanolic turmeric extract in female mice and rats. **Toxicology Letters**, v. 95(3), p.183-193, 1998.

DI GIULIO, R. T.; WASHBURN, P. C.; WENNING, R. J.; WINSTON, G. W.; JEWELL, C. S. Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. **Environmental Toxicology Chemistry**. v.8(12), p.1103-1123, 1989.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v.122(6), p.829-838, 2001.

ESER, A.; HIZLI, D.; NAMUSLU, M.; HALTAS, H.; KOSUS, N.; KOSUS, A.; KAFALI H. Protective effect of curcumin on ovarian reserve in a rat ischemia model: an experimental study. **Clinical and experimental obstetrics gynecology**, v.44(3), p.453-457, 2017.

FAO, 2004. Chemical and Technical Assessment. 61st JECFA. Food and Agriculture Organization.

FARGHALY, H.; HUSSEIN, M. Protective effect of curcumin against paracetamol-induced liver damage. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 4(9), p.4266–4274, 2010.

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

GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B. B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. **Journals - American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 15(1), p.195–218, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HEMEIDA, R.; MOHAFAEZ, O. Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v.20(2), p. 141–148, 2008.

HEWLINGS S. J.; KALMAN D. S. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods**. v.6(10), e92, 2017.

- IQBAL, M.; SHARMA, S.; OKAZAKI, Y.; FUJISAWA, M.; OKADA, S. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. **Pharmaceutical Toxicology**, v.92(1), p.33–38, 2003.
- JAESCHKE, H. Cap. 13: Toxicidade hepática pela exposição a xenobióticos. In: KLAASSEN, C.D; WATKINS, J.B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull**. 2 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- JARUGA, E.; SALVIOLI, S.; DOBRUCKI, J.; CHRUL, S.; BANDOROWICZ-PIKUTA, J.; SIKORA, E.; FRANCESCHI, C.; COSSARIZZA, A.; BARTOSZ, G. Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. **FEBS letters**. v.433(3), p.287-293, 1998.
- KÁDASI, A.; MARUNIKOVÁ, N.; ŠTOCHMALOVÁ, A.; BAUER, M.; GROSSMANN, R.; HARRATH, A. H.; KOLESÁROVÁ, A.; SIROTKIN, A. V. Direct effect of curcumin on porcine ovarian cell functions. **Animal Reproduction Science**, 182:77-83, 2017.
- KANG, J.; CHEN, J.; SHI, Y.; JIA, J.; ZHANG, Y. Curcumin-induced histone hypoacetylation: The role of reactive oxygen species. **Biochemical Pharmacology**, v.69(8), p.1205-1213, 2005.
- KUNTZ, E.; KUNTZ, H.D. **Hepatology: textbook and atlas**. 3 ed. Berlin: Springer, 2008.
- LEE J. H.; OH, J. H.; LEE, Y. J. Biliary excretion of curcumin is mediated by multidrug resistance-associated protein 2. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.35(5), p.777–780, 2012.
- LEE, C. H.; PARK, S. W.; KIM, Y. S.; KANG, S. S.; KIM, J. A.; LEE, S. H. Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. **Biological and Pharmacological Bulletin**, v.30(10), p.1898-1904, 2007.
- LEE, K. S.; LEE, S. J.; PARK, H. J.; CHUNG, J. P.; HAN, K. H.; CHON, C. Y.; LEE, S. I.; MOON, Y. N. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. **Yonsei Medical Journal** v.42(1), p.1-8, 2001.
- LIN, Y. G.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NAIR, A.; MERRITT, W. M.; HAN, L.Y.; ARMAIZ-PENA, G. N.; KAMAT, A. A.; SPANNUTH, W. A.; GERSHENSON, D. M.; LUTGENDORF, S. K.; AGGARWAL, B. B.; SOOD, A. K. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-κB pathway. **Clinical cancer research**, v.13 (11), p.3423–3430, 2007.

- MARONPOT, R. R.; YOSHIZAWA, K.; NYSKA, A.; HARADA, T.; FLAKE, G.; MUELLER, G.; SINGH, B.; WARD, J. M. Hepatic enzyme induction: histopathology. **Toxicologic Pathology**, v.38(5), p.776-795, 2010.
- MARRA, F.; GALASTRI, S.; ALEFFI, S.; PINZANI, M. Chapter 3: Stellate Cells. In: DUFOUR, J. F.; CLAVIEN, P. A. **Signaling pathways in liver diseases**. 2 ed. Berlin: Springer, 2010.
- MATHURIA, N.; VERMA, R. Curcumin ameliorates aflatoxin-induced lipid peroxidation in liver, kidney and testis of mice – an in vitro study. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v.64(5), p.413–416, 2007.
- MATZUK, M. M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v.296(5576), p.2178-2190, 2002.
- McNALLY, S. J.; HARRISON E. M.; ROSS J. A.; GARDEN O. J.; WIGMORE S. J. Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. **International Journal of Molecular Medicine**, v.19(1), p.165–72, 2007.
- MELEKOGLU, R.; CIFTCI, O.; ERASLAN, S.; CETIN, A.; BASAK, N. Beneficial effects of curcumin and capsaicin on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in a rat model. **Journal of ovarian research**, v.11(1), 33, 2018.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monografia da espécie Curcuma longa L. (CURCUMA)**. Organização: Ministério da Saúde e Anvisa. Brasília. 2015.
- PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**, v.32(6), p.1053–1064, 2014a.
- PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. Cancer Research and Treatment: **Official Journal of Korean Cancer Association**, v.46(1), p.2–18, 2014b.
- PRIYA, S.; SUDHAKARAN, P. Curcumin-induced recovery from hepatic injury involves induction of apoptosis of activated hepatic stellate cells. **Journal of Biochemistry e Biophysics**, v. 45(5), p.317–325, 2008.
- QIU, P.; SUN, J.; MAN, S.; YANG, H.; MA, L.; YU, P.; GAO, W. Curcumin Attenuates N-Nitrosodiethylamine-Induced Liver Injury in Mice by Utilizing the Method of Metabonomics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.65(9), p.2000-2007, 2017.
- ROY-CHOWDHURY, N.; ROY-CHOWDHURY, J. Cap.72. Fisiologia e metabolismo energético do fígado. In: FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L.S.; BRANDT, L.J.

**Tratado gastrointestinal e doenças do fígado de Sleisenger e Fordtran.** 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

SALLES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34(3), p185-194, 2010.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J.; Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1822(12), p.1896-1912, 2012.

SOTO-GUTIERREZ, A.; NAVARRO-ALVAREZ, N.; KOBAYASHI, N. Chapter 3: Hepatocytes. In: MONGA, S.P.S. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. New York: Springer, 2011.

STEIB, C.J.; GERBES, A.L. Chapter 4: Signaling pathways in liver diseases Kupffer cells. In: DUFOUR, J.F.; CLAVIEN, P.A. **Signaling pathways in liver diseases**. 2 ed. Berlin: Springer, 2010.

TSUNG, A.; GELLER, D.A. Chapter 1: Gross and cellular anatomy of the liver. In: MONGA, S.P.S. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. New York: Springer, 2011.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63(6), p.1717-1751, 2005.

VERA-RAMIREZ, L.; PÉREZ-LOPEZ, P.; VARELA-LOPEZ, A.; RAMIREZ-TORTOSA, M.; BATTINO, M.; QUILES, J. L. Curcumin and liver disease. **BioFactors**, v.39(1), p.88–100, 2013.

YAN, Z.; DAI, Y.; FU, H.; ZHENG, Y.; BAO, D.; YIN, Y.; CHEN, Q.; NIE, X.; HAO, Q.; HOU, D.; CUI, Y. Curcumin exerts a protective effect against premature ovarian failure in mice. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.60(3), p.261-271, 2018.

YANG K, Y.; LIN, L. C.; TSENG, T. Y.; WANG, S. C.; TSAI, T. H. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC–MS/MS. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.15(1), p.183–190, 2007.

ZHAO, H.-L.; SONG, C. H.; CHAI, O. H. Negative Effects of Curcumin on Liver Injury Induced by Alcohol. **Phytotherapy Research**, v.26(12), p.1857–1863, 2012.

## 4. CAPÍTULO 1

---

### EFEITO DE ALTAS DOSES DE CURCUMINA NO FÍGADO DE CAMUNDONGAS SAUDÁVEIS

Talita Amorim Santos<sup>1</sup>, Luiz Carlos Maia Ladeira<sup>1</sup>, Janaína da Silva<sup>1</sup>, Guilherme Augusto Viera Pereira<sup>1</sup>, Fernanda Carolina Ribeiro Dias<sup>1</sup>, Jerusa Maria de Oliveira<sup>2</sup> e Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> - Laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Biologia Geral da Universidade de Federal de Viçosa

<sup>2</sup> - Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa

#### RESUMO

Curcumina é um polifenol obtido a partir do rizoma de *Curcuma longa L.* com ampla utilização na forma de fitoterápico e também na indústria alimentícia como aromatizante, conservante e corante natural. Esta substância atua em diversos alvos moleculares e possui várias atividades biológicas, dentre elas, ação antioxidante, antiinflamatória, cicatrizante, antiviral, antitumoral, antiparasitária, bactericida e neuromoduladora. No entanto, ainda são escassos e conflitantes os estudos que avaliam os efeitos desse composto no fígado de indivíduos saudáveis. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi investigar se altas doses de curcumina podem influenciar na integridade do fígado de camundongos saudáveis. Para isso, foram utilizadas vinte e quatro camundongas Swiss, com noventa dias de idade, distribuídas aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: Grupo controle, tratado com dimetilsulfóxido (DMSO); e os grupos que receberam curcumina diluída em DMSO, nas dosagens de 250mg/kg (CUR-250), 500mg/kg (CUR-500) e 1000mg/kg (CUR-1000) de peso corporal, todos os tratamentos foram administrados diariamente, por via oral, durante 28 dias. Realizou-se análises bioquímicas no soro sanguíneo, avaliação do status oxidativo/nitrosativo hepático através da determinação de biomarcadores de estresse e de minerais que atuam no equilíbrio redox, análise de conteúdo de glicogênio hepático e análise histomorfométrica do fígado. Nossos

resultados mostraram que as doses de 500 ou 1000mg/Kg de curcumina contribuíram para o aumento dos níveis hepáticos de óxido nítrico e malondialdeído, biomarcadores de estresse oxidativo/nitrosativo e aumento da atividade da enzima antioxidante Glutathione S-transferase (GST). Também foram observadas alterações na biodisponibilidade dos microminerais Se, Zn, Cu e Fe. Principalmente nas duas doses mais altas de curcumina, foram registradas alterações significativas nos biomarcadores de função hepática, como aumento de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), bilirrubina, albumina e proteínas totais. Além disso, foram observadas alterações na reserva de glicogênio e aumento dos sinusóides. Diante do exposto, concluímos que, em dosagens baixas a curcumina não compromete a função hepática, porém em doses elevadas acarreta em aumento dos biomarcadores funcionais de lesão hepática, ação pró-oxidante alterações na biodisponibilidade de micro minerais e na reserva de glicogênio.

**Palavras-chave:** *Cúrcuma longa*, estresse oxidativo, hepatócitos, fígado e toxicidade.

## 1. INTRODUÇÃO

A Curcumina, também denominada diferulloylmetano, é o principal curcuminoide encontrado no rizoma de *Curcuma longa*, espécie pertencente à família do gengibre (Zingiberaceae) (Codevilla *et al.*, 2015; Ghosh *et al.*, 2015). Esse composto é amplamente utilizado como conservante, aromatizante e corante natural em bebidas e em alimentos como curry, mostarda, queijos, sorvetes, iogurtes e margarina, substituindo corantes artificiais (Prasad *et al.*, 2014; Gómez-Estaca *et al.*, 2015).

Além do seu amplo uso na culinária, nas últimas décadas, esse polifenol tem atraído a atenção de diversos pesquisadores por conta de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Prasad *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2015). Diversos estudos foram publicados destacando os efeitos benéficos da curcumina e repetidamente se afirmado que este produto natural é eficiente e seguro para a prevenção e tratamento de várias doenças, incluindo as doenças hepáticas como: fibrose, cirrose, hepatite e esteatose (Rivera-Espinoza e Muriel *et al.*, 2009; Vera-Ramirez *et al.*, 2013; Hewlings e Kalman, 2017).

Apesar dos seus efeitos benéficos, existem relatos de que a curcumina pode não ser tão segura em condições específicas. Em 1993, o Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos relatou as propriedades tóxicas e cancerígenas de um extrato orgânico de cúrcuma (com 79-85% de curcumina). Também foi relatado que a curcumina pode induzir dano ao DNA mitocondrial e nuclear, em concentrações acima de 20µg/ml por exercer ação pró-oxidante (Cao *et al.*, 2006). Estudos têm relatado que a curcumina pode exercer efeitos hepatotóxicos ao promover estresse oxidativo, inflamação, degeneração hidrópica, necrose focal e aumento nos níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e  $\gamma$ -glutamiltanspeptidase ( $\gamma$ -GGT) (Deshpande *et al.*, 1998; Balaji e Chempakam, 2010; Zhao *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2016).

Apesar dessas evidências, os curcuminoídeos foram aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) na categoria GRAS "Geralmente Reconhecido como Seguro" (Gupta *et al.*, 2013). Nesse contexto, sabendo-se que a principal via de eliminação da curcumina é pela bile (Holder *et al.*, 1978; Lee *et al.*, 2012) e que o uso

de produtos naturais pela população é indiscriminado, faz-se necessário entender o impacto que altas doses de curcumina causariam ao fígado. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi investigar em que medida altas doses de curcumina podem influenciar na integridade do fígado de animais saudáveis.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados 24 camundongas Swiss, com 90 dias de idade, pesando  $31,7 \pm 2,5$ g (média  $\pm$  desvio padrão), obtidas no Biotério Central e mantidas no Biotério Experimental do Departamento de Biologia Geral, ambos da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, mantidos sob condições controladas de luminosidade (ciclos de 12/12 horas claro/escuro), temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidade relativa do ar (45% a 55%) e com acesso a ração e água *ad libitum*. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) e registrado sob o protocolo nº 555/2016.

### **2.2 Delineamento experimental**

Após 15 dias de aclimação, os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=6). O grupo controle (DMSO) recebeu 0,2ml de dimetilsulfóxido (DMSO) por animal, e os outros grupos receberam curcumina pura natural (VETEC -Lote: DCBD5305V), diluída em DMSO, nas seguintes doses: 250mg/Kg (CUR-250), 500mg/Kg (CUR-500), e 1000mg/Kg (CUR-1000) de peso corporal. A administração foi feita via oral, por gavagem, durante 28 dias consecutivos, sendo que cada animal recebeu um volume de 0,2ml por dia. O DMSO foi escolhido como veículo devido a curcumina possuir baixa solubilidade em água (anand *et al.*, 2007), o que torna necessária a utilização de um solvente hidrofóbico. Além disso, o DMSO é considerado um solvente orgânico não tóxico com intensa capacidade de penetração nas membranas biológicas (brayton, 1986; slabber *et al.*, 2016).

### **2.3 Eutanásia, coleta de material biológico e parâmetros biométricos.**

Após 24h da última administração, os animais foram pesados anestesiados (quetamina 150mg/kg/ip e xilazina 10mg/kg/ip) e submetidos a eutanásia por exsanguinação por meio da punção cardíaca. O fígado foi rapidamente removido, pesado em balança analítica e dividido em dois fragmentos: um foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C, para análise de estresse oxidativo e índice de edema (IE), e o outro foi fixado por imersão em solução fixadora Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24h para análises histológicas. O fragmento do tecido hepático congelado foi utilizado para determinar o índice de edema (teor de água por unidade de peso do tecido, mL/g), por meio da subtração entre a massa fresca e a massa seca do fragmento (peso úmido - peso seco) (Novaes *et al.*, 2012).

Para cálculo da variação de Peso Corporal (PC), os animais foram pesados no início e no final do experimento. O índice hepatossomático (IHS) foi obtido pela relação entre o peso do fígado (PF) e o peso corporal final (PCF), sendo  $IHS = PF/PCF \times 100$  (Novaes *et al.*, 2012).

### **2.4 Análises sorológicas**

As amostras de sangue coletadas durante a eutanásia foram centrifugadas a 4600 rpm por 20 minutos. O soro foi coletado e usado para a dosagem de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), colesterol total e suas frações (LDL, HDL, VLDL), triglicerídeos, bilirrubina, albumina e proteínas totais. As análises foram realizadas utilizando-se kits (Bioclin Laboratórios, Belo Horizonte, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

### **2.5 Análise de estresse oxidativo/nitrosativo**

O fígado congelado foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) 0,2 M combinado com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1M e a suspensão centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi utilizado para a análise da atividade (100mg de tecido por mL) das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), concentração de metabólitos do óxido nítrico ( $NO_2^-$  e  $NO_3^-$ ), taxa de peroxidação lipídica (MDA) e dos níveis de proteína total, sendo as análises realizadas

em duplicata. Os dados foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas com o uso de espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou leitor de ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA EUA).

A atividade da SOD foi mensurada nos tecidos em leitor de microplacas ( $\lambda = 570$  nm) baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido  $O_2^-$  e o peróxido de hidrogênio (Dieterich *et al.*, 2000). A atividade da CAT foi determinada pela taxa de queda da absorbância do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (AEBI, 1984) e a atividade da GST pela formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). (Habig; Pabst; Jakoby, 1974). O nível de óxido nítrico (NO) foi quantificado indiretamente, por meio do teor de nitrito ( $NO_2$ ) e nitrato ( $NO_3$ ) pela reação de Griess padrão (Ricart-Jané *et al.*, 2002). Os níveis de malondialdeído (MDA) resultante da peroxidação lipídica, foram determinados de acordo com Buege e Aust (1978). A oxidação de proteínas foi analisada pela quantificação de proteínas carboniladas em *pellets* de tecido hepático usando o método 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Levine *et al.*, 1990).

## **2.6. Análise de minerais no fígado**

A proporção de selênio (Se), zinco (Zn), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e magnésio (Mg) foi quantificada no fígado utilizando a metodologia de EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) (Novaes *et al.*, 2013). Fragmentos de fígado, previamente fixados em solução Karnovsky e armazenados em álcool 70% foram secos em estufa a  $60^\circ C$  por 96h, cobertos com camada de carbono utilizando um evaporador de carbono (Quorum Q150 T, EastGrinstead, West Sussex, England, UK), e analisados em microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Carl Zeiss, Jena, Thuringia, Germany) com sonda detectora de raios-X (Tracor TN5502, Middleton, WI, USA). A análise foi realizada em aumento de 150x usando voltagem de aceleração de 20 kV e distância de trabalho de 10mm (Ladeira *et al.* 2019). Os dados foram normalizados pelas medidas de carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), fósforo (P) e enxofre (S). Os resultados foram expressos em valor médio.

## **2.7 Análises histomorfométrica, histopatológica e estereológica**

Os fragmentos do fígado, destinados as análises histológicas, foram desidratados em série etanólica crescente e incluídos em historesina (Leica ®). Secções de 3µm de espessura foram obtidas utilizando-se micrótomo rotativo semiautomático (Leica ® RM2255) e navalhas de vidro. As secções foram feitas de modo semi-seriado com intervalos regulares de 30µm. Para as análises histomorfométricas e histopatológicas, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e para marcação de glicogênio foi realizada a coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS). Todas as preparações foram montadas com o meio de montagem Entellan® (Merck, Frankfurt, Germany) e posteriormente fotografadas em microscópio de campo claro (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan) com lente objetiva de 20x equipado com câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan). As análises histológicas foram realizadas com auxílio do software Image J 1.48v (National Institute of Health, USA).

A proporção dos componentes hepáticos como núcleo e citoplasma de hepatócitos, outras células (células de kupffer e células estreladas), vacúolos citoplasmáticos, sinusoides e vasos sanguíneos, foi determinada após a contagem de 1064 pontos por animal, utilizando uma grade de 266 pontos projetada aleatoriamente sobre as imagens digitais. A análise histopatológica foi realizada através da identificação de infiltrados inflamatórios, focos de necrose e esteatose em doze cortes histológicos por animal.

Para a análise estereológica, o diâmetro nuclear dos hepatócitos foi medido em 10 fotos por animal (cinco núcleos por foto), utilizando-se o programa Image J. Com base no diâmetro nuclear e na densidade volumétrica dos hepatócitos, foram calculados o volume nuclear, volume citoplasmático e o volume total de cada hepatócito, sendo estes valores expressos em micrômetros cúbicos ( $\mu\text{m}^3$ ). Para tais cálculos foram utilizadas as seguintes equações:

Volume nuclear =  $4/3\pi R^3$ , onde R = raio nuclear;

Volume citoplasmático = % citoplasma x volume nuclear / % núcleo;

Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático.

## 2.8 Concentração de glicogênio hepático

O glicogênio foi extraído de acordo com o método descrito por (Hassid e Abrahams, 1957). Resumidamente, amostras frescas de fígado (50 mg) foram digeridas por aquecimento (100 ° C) em 0,5 mL de 5 N KOH por 60 min. O glicogênio foi purificado e precipitado por etanol 99% em água fervente e, em seguida, centrifugado a 8000 × g por 20 min. Os peletes obtidos foram ressuspensos em água destilada (1 mL) e 3 mL de solução de antrona (50 mg diluída em 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 84%) e incubados por 10 min a 100 ° C. O OD foi medido a 620 nm (Power Wave X).

## 2.9 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a avaliação de normalidade e pelo teste de Shapiro-Wilk e em seguida feita a análise de variância ANOVA “one-way” seguida pelo teste *post hoc* de Holm-Sidak. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (média ± DP). A significância estatística foi estabelecida como  $p \leq 0,05$ . Todas as análises foram feitas no software GraphPad Prism 6.0.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Parâmetros biométricos e hepáticos

Todos os grupos apresentaram valores semelhantes ( $P > 0,05$ ) quanto aos parâmetros biométricos, índice hepatossomático e teor de água no tecido hepático, independentemente da dose de curcumina administrada durante o experimento (Tabela 1).

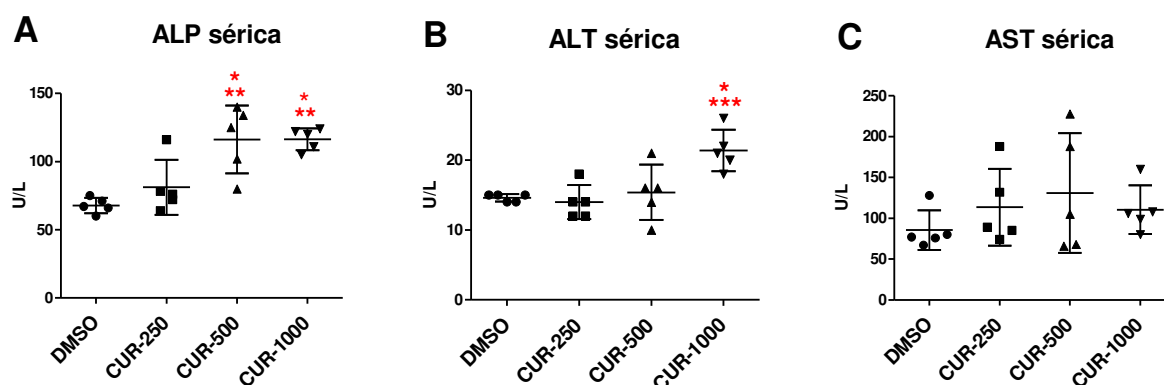
**Tabela 1.** Parâmetros biométricos e hepáticos de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina.

Parâmetros biométricos	DMSO	CUR-250	CUR-500	CUR-1000
Peso corporal inicial (g)	32,2 ± 3,4	30,4 ± 1,9	32,1 ± 3,1	31,3 ± 2,8
Peso corporal final (g)	31,7 ± 1,7	30,1 ± 1,3	32,5 ± 2,5	33,2 ± 3,2
Variação do peso corporal (g)	- 0,4 ± 2,5	- 0,3 ± 1,4	0,4 ± 2,5	1,9 ± 1,5
Peso do fígado (g)	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,2
IHS (%)	3,8 ± 0,2	4,3 ± 0,4	4,2 ± 0,6	4,4 ± 0,3

Média±DP. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0,05$ , n = 6. IHS: Índice hepatossomático, IE: Índice de edema.

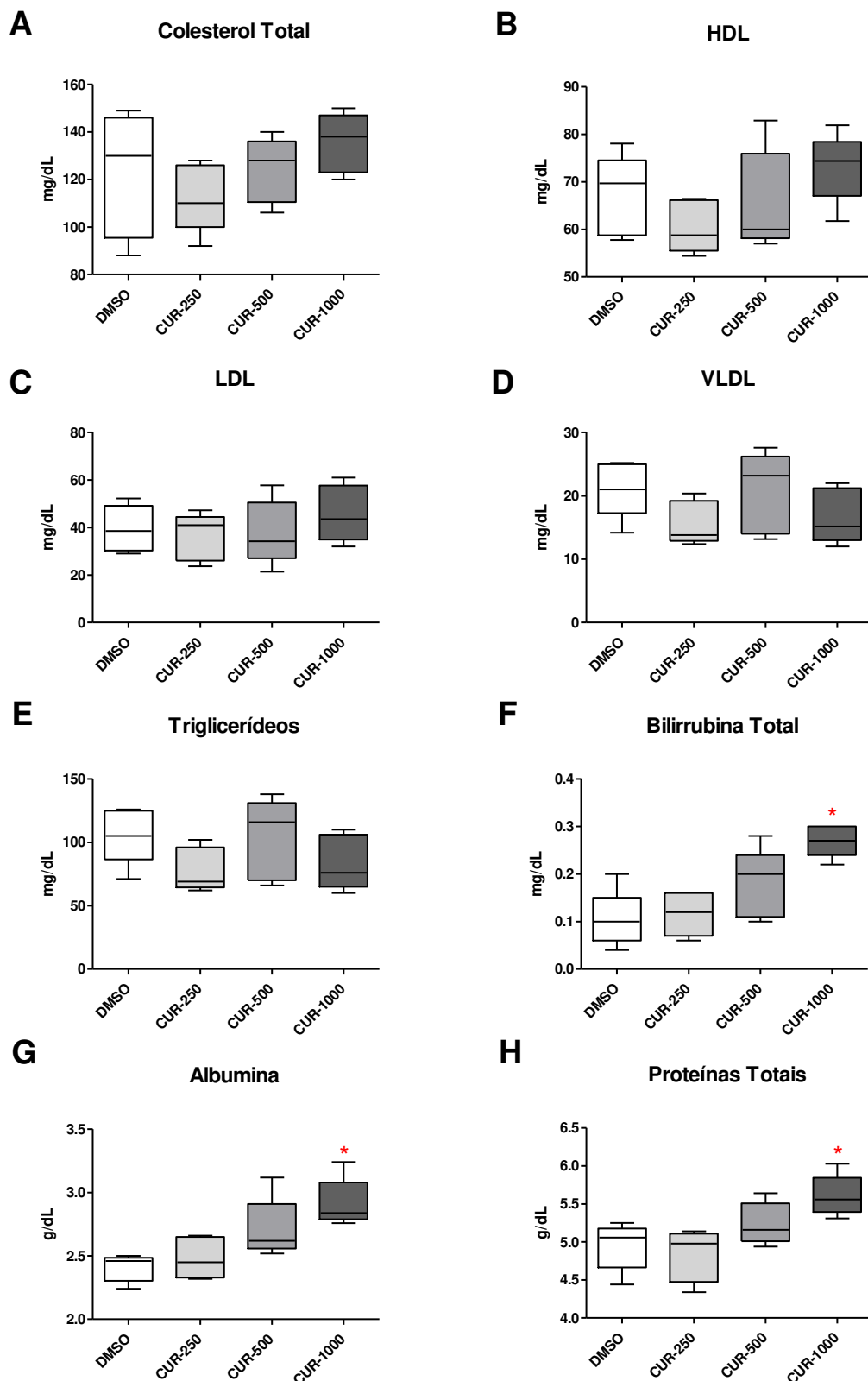
### 3.2 Análises sorológicas

A administração de curcumina elevou os níveis da enzima ALP nos grupos CUR-500 e CUR-1000, quando comparados com o grupo controle (DMSO) (Fig. 1A). Em relação as transaminases, os níveis de AST não foram alterados com o tratamento, enquanto que os níveis de ALT foram aumentados no grupo CUR-1000 (Figura. 1B e C).



**Figura 1.** Níveis de fosfatase alcalina (A) e transaminases (B e C) no soro de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. Cada ponto representa um dado, com média (linha horizontal) e desvio padrão (linha vertical) representados. ALP: fosfatase alcalina; ALT: alanina transaminase; AST: aspartato transaminase. \* Diferente de DMSO ( $p < 0.001$ ). \*\* Diferente de 250mg ( $p < 0.05$ ). \*\*\* Diferente de CUR-250 e CUR-500 ( $p < 0.05$ ). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ ,  $n = 5$ .

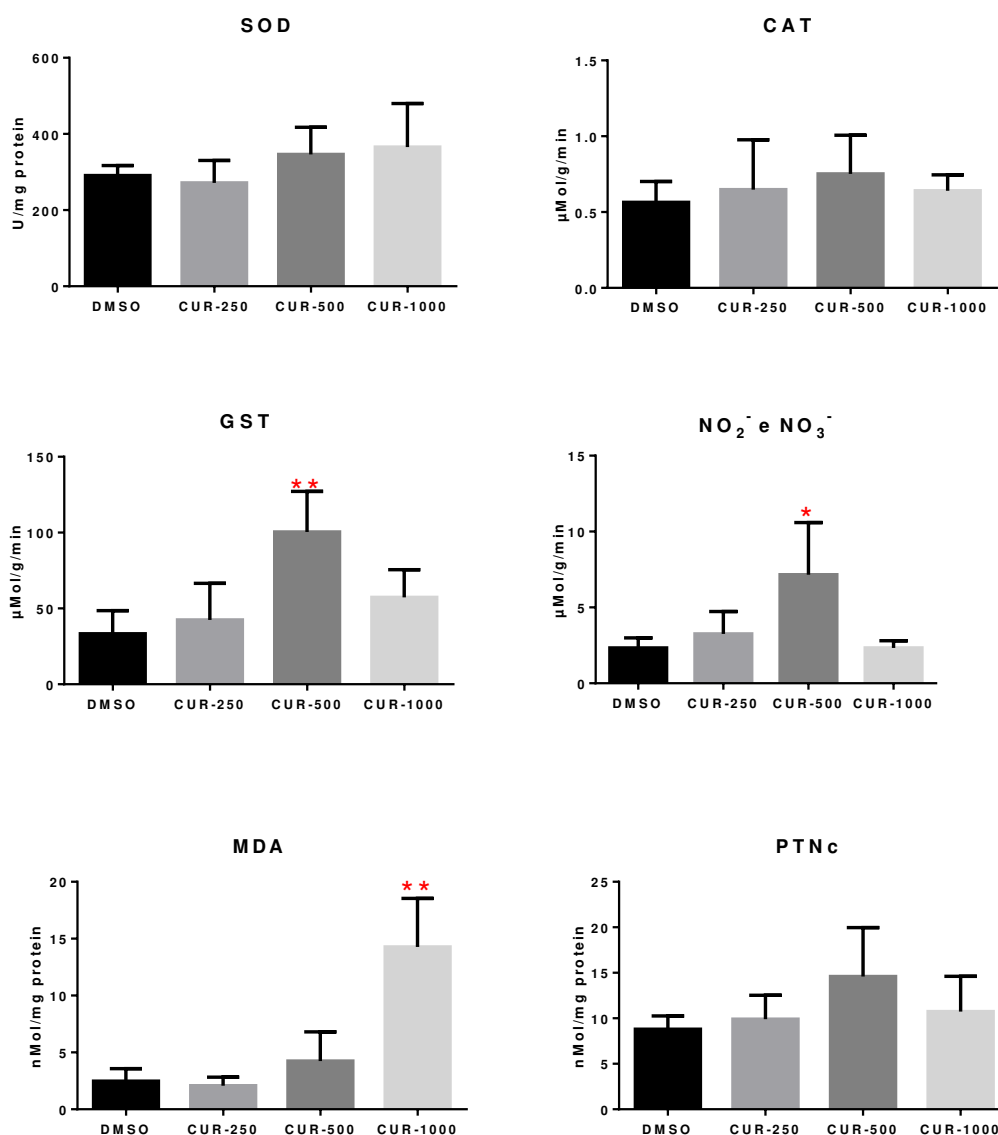
Os níveis de colesterol total (Figura. 2A) e suas frações (HDL, LDL e VLDL) (Figura. 2B, C e D) e de triglicerídeos (Figura. 2E), não foram alterados com a administração da curcumina. Já as concentrações de bilirrubina e albumina foram maiores no grupo da maior dose em relação ao grupo controle e CUR-250 (Figura. 2F e G). O grupo CUR-1000 apresentou uma maior concentração de proteína total o que é justificado pelo aumento de ALT, ALP, Albumina e Bilirrubina (Figura. 2H).



**Figura 2.** Parâmetros sorológicos de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. A caixa representa os intervalos interquartis com a média indicada (linha horizontal) e as barras representam os quartis superior e inferior. \* Diferente de DMSO e CUR-250 ( $p < 0.004$ ). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ ,  $n = 5$ .

### 3.3 Marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo e conteúdo mineral

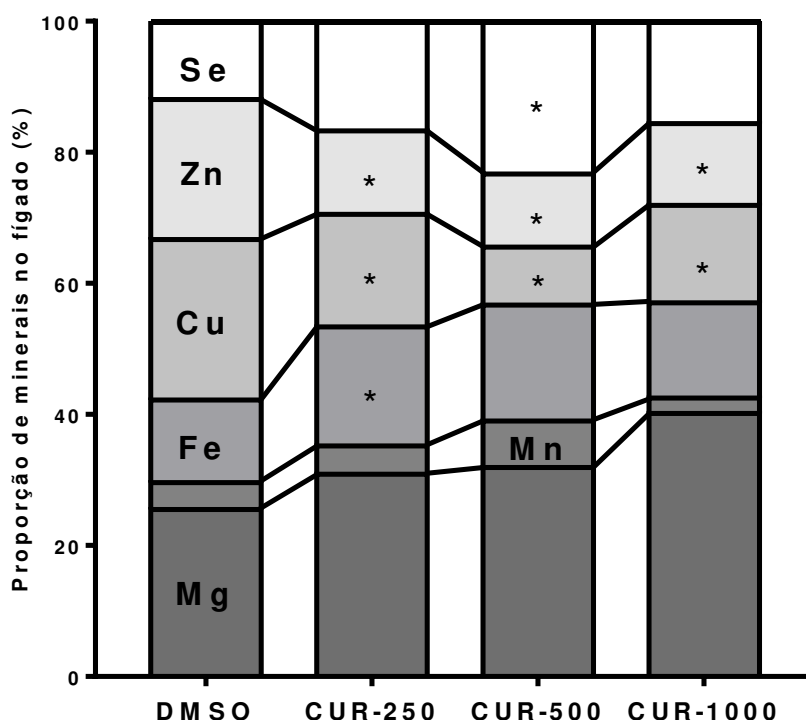
A concentração das enzimas antioxidantes SOD e CAT, não se alterou no tecido hepático dos animais tratados com curcumina (Figura 3A e B). No entanto, no grupo CUR-500 foi observado aumento da atividade de GST e dos metabólitos do NO (Figura 3C e D). Já o grupo CUR-1000 apresentou aumento na quantidade de MDA que é um marcador de peroxidação lipídica (Figura 3E). Os níveis de proteína carbonilada não foram alterados nos tratamentos com curcumina (Figura 3F).



**Figura 3.** Atividade das enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo em fígado de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutatona S-transferase; Metabólitos do óxido nítrico ( $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}_3$ ); MDA: malondialdeído; PTNc: proteínas carboniladas. A barra representa a média, o desvio padrão é indicado logo acima. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post*

*hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ ,  $n = 5$ . \* Diferente de todos os outros grupos ( $p < 0.02$ ). \*\* Diferente de DMSO e CUR-250 ( $p < 0.01$ ).

Os minerais em níveis percentuais estão representados na Figura 4. Enquanto a porcentagem dos elementos Zn e Cu diminuiu significativamente independente da dose de curcumina, em comparação com o grupo controle, os níveis de Fe e Se aumentaram nos grupos CUR-250 e CUR-500 respectivamente ( $P < 0,04$ ). A proporção de manganês (Mn) e magnésio (Mg) não foi alterada com a administração de curcumina.

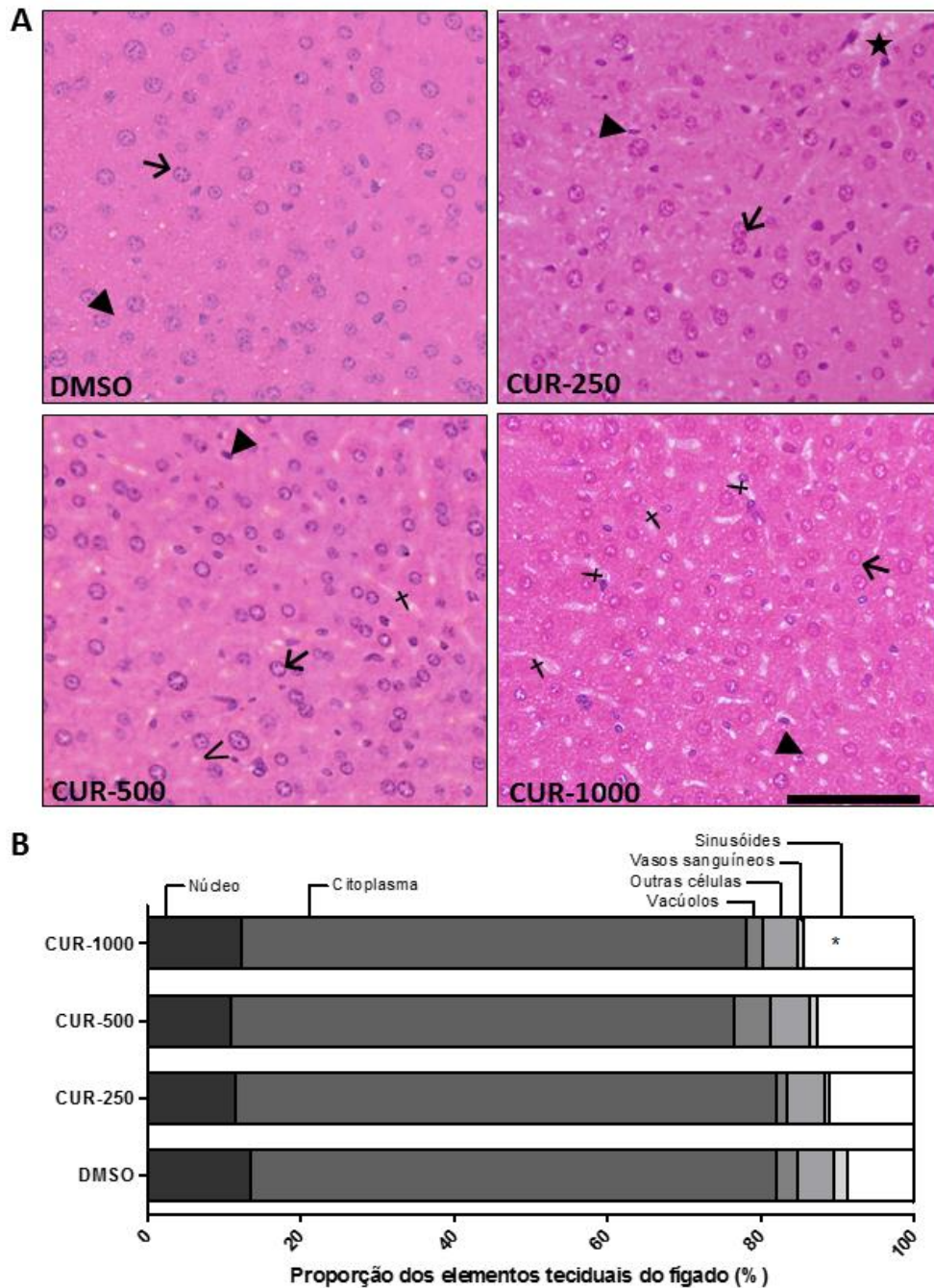


**Figura 4.** Proporção de minerais no fígado de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. Se: selênio; Zn: zinco; Cu: cobre; Fe: ferro; Mn: manganês; Mg: magnésio. A proporção foi calculada entre os valores destes elementos. O asterisco (\*) representa diferenças entre as médias dos grupos tratados com curcumina e o grupo controle (DMSO) ( $p < 0.05$ ). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ ,  $n = 5$ . \* Diferente de DMSO ( $p < 0.04$ ).

### 3.4 Parâmetros histomorfométricos, estereológicos, e histopatológicos hepáticos

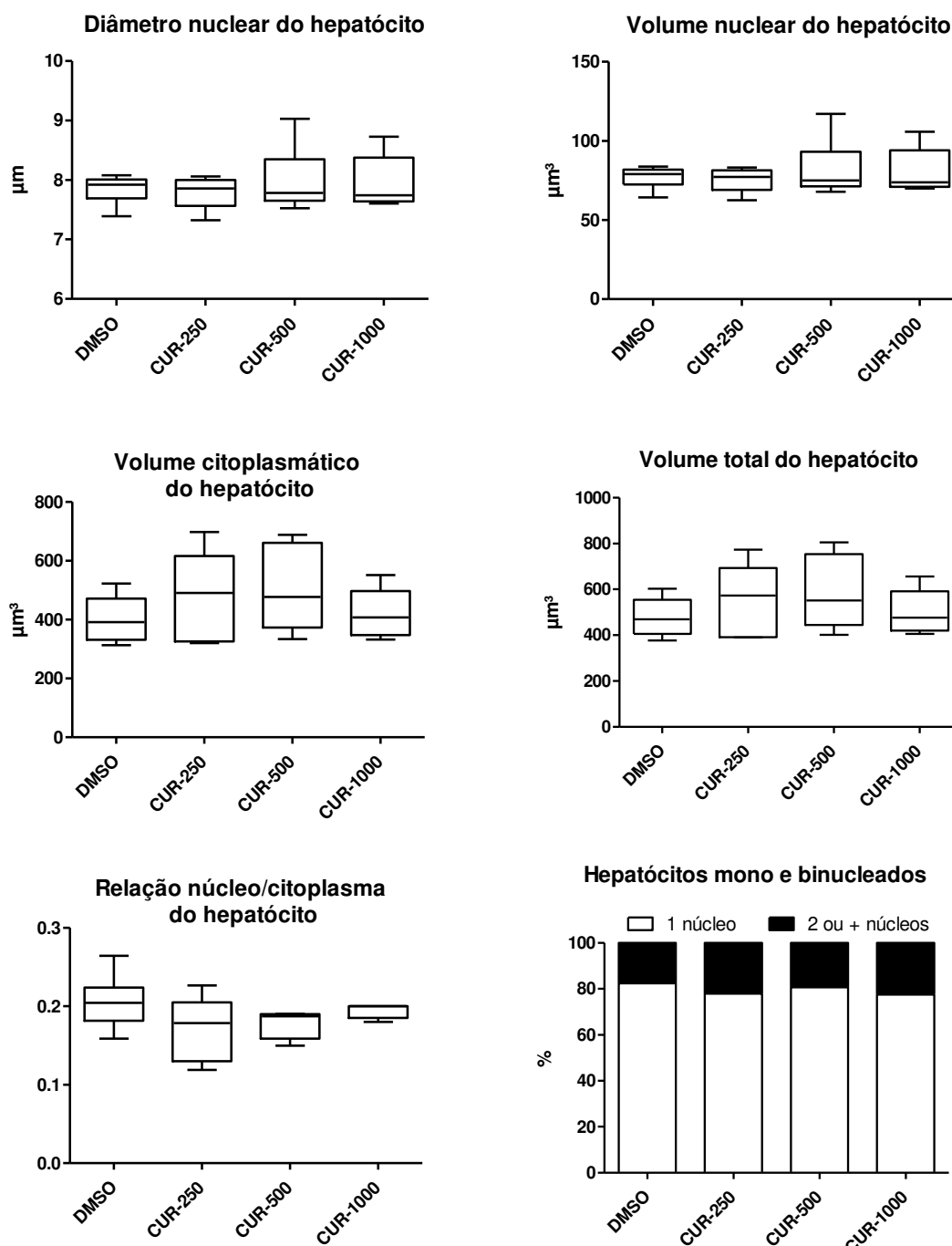
A análise da proporção dos componentes hepáticos foi utilizada para avaliar as alterações que os tratamentos com curcumina poderia ocasionar na composição estrutural do fígado. Dentre os parâmetros avaliados, os capilares sinusoides foi o único que sofreu alteração com a administração da curcumina, apresentando maior

proporção no grupo CUR-1000 em relação ao grupo controle (Figura 5). Não foram observadas de forma significativa alterações como infiltrado inflamatório, necrose e esteatose nos fígados do grupo controle e dos grupos tratados com curcumina.



**Figura 5.** Fotomicrografias representativas de secções histológicas **(A)** e proporção (%) **(B)** dos elementos teciduais do fígado de camundongos tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. (→) núcleo de hepatócito; (▶) outras células (kupffer, ito, endoteliais); (>) vacúolos citoplasmáticos; (★) vasos sanguíneos; (†) capilares sinusóides. Barra: 40µm. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ ,  $n = 6$ . \* Diferente de DMSO ( $p < 0.02$ ).

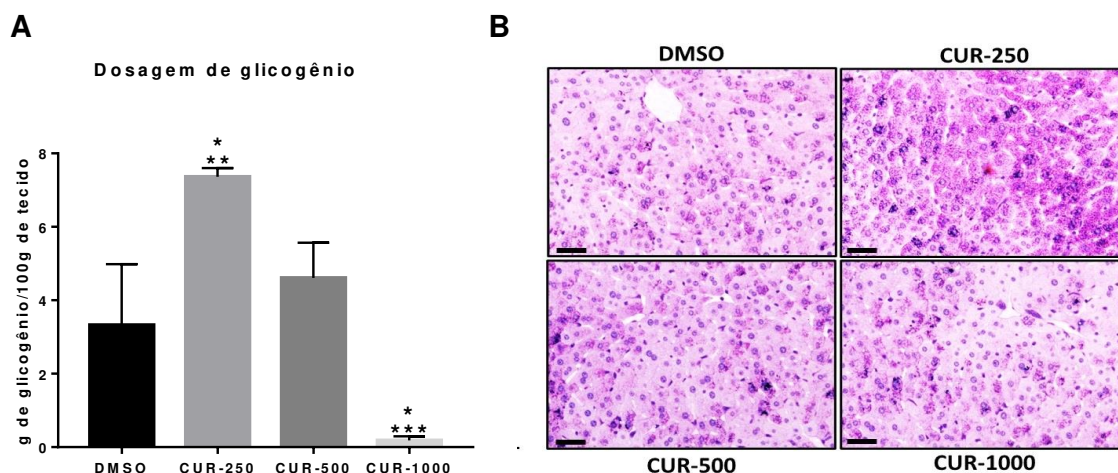
A análise estereológica e a proporção de hepatócitos mononucleados e binucleados não apresentaram alteração significativa nos grupos tratados com curcumina em relação ao grupo controle (Figura 6).



**Figura 6.** Diâmetro nuclear, parâmetros estereológicos e proporção de hepatócitos mono e binucleados do fígado de camundongos tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. A caixa representa os intervalos interquartis com a média indicada (linha horizontal) e as barras representam os quartis superior e inferior. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ ,  $n = 6$ .

### 3.5 Concentração de glicogênio hepático

A concentração de glicogênio hepático aumentou significativamente ( $P \leq 0,05$ ) no fígado dos animais que receberam a menor dose de curcumina. Por outro lado, o grupo que recebeu a maior dose (1000mg/kg/PC) teve uma redução da concentração desse homopolissacarídeo em comparação aos demais grupos (Figuras 5 A e B).



**Figura 7. A.** Dosagem de glicogênio hepático em camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. **B.** Fotomicrografias representativas de seções histológicas do fígado de camundongos fêmeas adultas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. Coloração: PAS. Bar: 40µm. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida pelo teste *post hoc* Holm-Sidak, considerando a significância estatística como  $P \leq 0,05$ ,  $n = 5$ . Um asterisco (\*) representa diferente de DMSO. Dois asteriscos (\*\*) representam diferente de CUR-500 e CUR-1000. Três asteriscos (\*\*\*) representam diferente de CUR-250 e CUR-500.

## 4. DISCUSSÃO

Embora muitos estudos tenham reforçado as propriedades farmacológicas da curcumina (Hewlings e Kalman 2017; Rivera-Espinoza e Muriel 2009) e seu uso extensivo associado a cuidados à saúde (Cheng *et al.* 2001; Ghosh, Banerjee e Sil 2015; Palipoch *et al.* 2014 ) a literatura ainda carece de esclarecimentos sobre o impacto que altas doses desse composto causariam no fígado, principalmente de animais saudáveis. Considerando o papel representativo deste órgão para metabolização e desintoxicação no corpo de mamíferos e o fato de que a excreção da curcumina ocorre através das vias hepatobiliares, nosso estudo avaliou o efeito

biológico da administração oral de três doses de curcumina no fígado de animais experimentais saudáveis.

As doses de curcumina (250, 500 e 1000mg/kg) utilizadas nesse estudo, após conversão para humano pelo método BSA (Body Surface Área – método para cálculo da dosagem com base na área de superfície corporal) correspondem a doses diárias de 1,26g, 2,43g e 4,86g, respectivamente, considerando um adulto de 60kg (Reagan-Shaw *et al.*, 2018). Com essa conversão, a dosagem utilizada nesse trabalho é inferior àquela consumida por humanos (8g/dia) por um período de três meses em um estudo de ensaio clínico, o qual concluiu que a curcumina não é tóxica nessa dosagem (Cheng *et al.*, 2001). No entanto, nossos achados indicaram o potencial da curcumina em aumentar os biomarcadores funcionais de lesão hepática, um perfil modulatório do estado oxidativo do fígado associado a biodisponibilidade de micro minerais além de alterações na reserva de glicogênio.

Após vinte e oito dias consecutivos de tratamento, nenhuma dose de curcumina foi suficiente para induzir diferenças nos pesos corporais e nos pesos do fígado (absoluto e relativo), indicando ausência de edema sem qualquer sinal de hepatomegalia. O mesmo perfil de resposta para essas variáveis foi relatado por Liju e colaboradores ao administrar óleo essencial de cúrcuma (composto rico em curcumina) a ratos Wistar machos e fêmeas por 13 semanas (Liju, Jeena e Kuttan, 2013). No entanto, resultados diferentes foram observados em animais que receberam uma dieta com 5% de cúrcuma por um período prolongado (90 dias), os quais apresentaram redução significativa no ganho de peso corporal, tanto em camundongos quanto em ratos, aumento dos pesos absoluto e relativo do fígado em camundongos e redução do peso absoluto do fígado em ratos (Deshpande *et al.*, 1998).

Embora a literatura tenha destacado que a curcumina apresenta baixa biodisponibilidade no organismo (Anand *et al.* 2007; Marczylo *et al.* 2007) devido à sua baixa solubilidade, tem sido demonstrado efeitos benéficos no perfil de funcionalidade hepática induzido por uma variedade de composto tóxico (por exemplo, metais pesados e medicamentos) (Park *et al.* 2000; Sayed e El-Kordy, 2014). Sayed e El-Kordy mostraram em seu experimento, usando coelhos com hepatotoxicidade induzida por paracetamol, que a suplementação com curcumina em doses de 50 e

100 mg/Kg reduziu os níveis elevados de AST, ALT e ALP e aumentou os níveis de proteína total e albumina no plasma (Sayed e El-Kordy, 2014). Em outro estudo, o pré-tratamento com curcumina, em ratos com lesão hepática, induzido por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) preveniu o aumento de ALT e AST, reduziu a peroxidação lipídica e inibiu o dano hepático (Park *et al.* 2000).

Diferente do exposto acima, vimos que no fígado de animais saudáveis alguns biomarcadores séricos da função hepática foram aumentados com a administração das duas doses mais altas de curcumina (500 e 1000mg/Kg). Sempre que o fígado sofre algum processo patológico que afeta a integridade dos hepatócitos é observado o aumento da atividade das aminotransaminases AST e ALT, sendo que a ALT aumenta mais ligeiramente do que a AST se a lesão for puramente hepática, pois essa enzima é mais abundante no fígado do que em outros órgãos (Giannini *et al.*, 2005; Schinoni, 2006; Kim *et al.*, 2008). Em nosso estudo os níveis séricos de AST não foram alterados com a administração da curcumina, no entanto, foi observado maior concentração sérica de ALT nos grupos que receberam as maiores doses (CUR-500 e CUR-1000) em relação ao grupo controle. Níveis elevados de ALT sérica são observados quando as membranas dos hepatócitos são lesionadas, o que permite que as enzimas presentes nessa célula extravasem para o sangue (Liu *et al.*, 2014; Knudsen *et al.*, 2016). O tratamento com curcumina também elevou os níveis de fosfatase alcalina (ALP) nos grupos CUR-500 e CUR-1000, enzima presente na membrana dos canalículos biliares (Giannini *et al.*, 2005). De acordo com Vasconcelos e colaboradores (2007), a elevação sérica dessa enzima indica alterações no fluxo biliar. O grupo CUR-1000 além do aumento de ALP também apresentou aumento nos níveis de bilirrubina total. Elevação nos níveis dessas enzimas é frequentemente associada ao quadro de colestase, que é ocasionado por obstrução do trato biliar que pode ser induzida por retenção de substâncias exógenas excretadas pela bile, como a curcumina (Costa *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012). Podemos inferir que a administração de altas doses de curcumina acarreta em eliminação volumosa desse composto através da bile, o que pode provocar distúrbio no fluxo biliar. Esses resultados indicam que a ingestão de curcumina acarretou em danos aos hepatócitos e comprometimento do fluxo biliar, pois as alterações nos níveis desses biomarcadores de hepatotoxicidade refletem para este perfil de resposta.

Se considerarmos apenas esta relação de biomarcadores com a disfunção das células hepáticas, conforme relatado anteriormente, tenderíamos a caracterizar as altas doses de curcumina avaliadas neste estudo para um perfil de toxicidade hepática. Entretanto, a análise de outros fatores deve estar associada, principalmente aqueles envolvidos no estado oxidativo hepático e integridade da organização estrutural do tecido para confirmar ou refutar essa hipótese.

A atividade antioxidante da curcumina já foi descrita por diversos pesquisadores (Shao *et al.* 2012; Vera-Ramirez *et al.* 2013; Palipoch *et al.* 2014), mas parece que essa atividade é condicionada pela dosagem ingerida e pelo status da integridade dos hepatócitos (McNally *et al.* 2007; López-Lázaro, 2008). McNally e colaboradores já haviam comprovado em um estudo *in vitro* tratando hepatócitos humanos com altas concentrações de curcumina (por exemplo, 50  $\mu\text{M}$ ) sua capacidade considerável de aumentar os metabólitos reativos de oxigênio (McNally *et al.* 2007). López-Lázaro também mostrou que em baixas concentrações, a curcumina exerce ação antioxidante reduzindo ou mantendo os níveis celulares das espécies reativas de oxigênio (ROS) dentro dos níveis fisiológicos, mas em altas concentrações, esse composto pode atuar como pró-oxidante e aumentar os níveis de ROS (López-Lázaro 2008). Nesta perspectiva, em nossa investigação vimos sensibilidade aumentada dos hepatócitos no grupo CUR-500 com concentração aumentada de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  caracterizando o estresse nitrosativo. O estresse nitrosativo pode ocorrer associado a um processo inflamatório, uma vez que biomoléculas como o óxido nítrico, estão envolvidas no processo de adesão dos leucócitos ao endotélio, um evento necessário no recrutamento dessas células para locais de inflamação (Charoensuk *et al.* 2011; Mouzaoui, Rahim, e Djerdjouri 2012). No entanto, apesar dessa relação, não observamos de forma significativa infiltrado inflamatório tecidual em nossa investigação. Porém, no grupo que recebeu a dose mais elevada (CUR-1000) foi encontrado aumento significativo da peroxidação lipídica no tecido hepático com aumento dos níveis de malondialdeído. Fang e colaboradores apontaram que o papel pró-oxidante da curcumina tem sido associado à sua capacidade de modificar de forma irreversível a tiorredoxina redutase (TrxR), uma enzima chave para a redução de ROS (Fang *et al.*, 2005). É sabido que a lesão hepática pode ser desencadeada por estresse oxidativo, pois a interação dos radicais livres com os lipídios da membrana celular resulta em peroxidação lipídica que leva à alteração da

permeabilidade dessa estrutura, modificação da atividade das enzimas ligadas às membranas e às proteínas de transporte, além de estar envolvida com a diminuição do potencial de membrana mitocondrial e, numa condição extrema, à morte celular (Benzie e Strain, 1996; Lima e Abdalla 2001; Jaeschke *et al.*, 2002). Segundo Balaji e Chempakam (2010), a curcumina e seus derivados causam lesões aos hepatócitos dependendo da dose.

Caracteristicamente, este perfil pró-oxidativo que altas doses de curcumina causaram no tecido hepático deve ser analisado associado à capacidade do sistema antioxidante endógeno dos hepatócitos em superar este evento pró-oxidativo (Contreras-Zentella e Hernández-Muñoz 2016; Kang e Choi 2017). A atividade enzimática também pode estar associada à biodisponibilidade de microminerais que são essenciais para o funcionamento do sistema antioxidante endógeno pois atuam como cofatores dessas enzimas (Soetan *et al.*, 2010; Bhattacharya *et al.*, 2016; Goff 2018). Apesar dessa abordagem, vimos que a peroxidação lipídica (CUR-1000) superou a capacidade de defesa antioxidante principalmente relacionada às enzimas SOD e CAT, que mantiveram seus valores, independente das doses administradas de curcumina. Embora tenhamos observado um aumento na proporção de mineral Fe no grupo CUR-250, mineral importante para a atividade de CAT, Cu (em todas as doses de curcumina) e Zn (CUR-1000), minerais associados à atividade de SOD (Vincent, *et al.*, 2007), foram significativamente reduzidos. Apesar de não termos encontrado alterações na atividade da SOD é sabido que a redução desses elementos pode comprometer a função antioxidante desta enzima (Barbosa *et al.* 2010). Além disso, o Zinco também é essencial para a integridade e funcionalidade das membranas celulares e a falta desse mineral pode afetar a função da membrana celular, alterando a fluidez, os canais de transporte de sódio e cálcio e até mesmo o equilíbrio osmótico da célula (O'Dell 2000). De acordo com Bettger e O'Dell, a perda de zinco da membrana celular é um dos primeiros sinais de depleção desse mineral no corpo (Bettger e O'Dell 1993).

Por outro lado, em resposta à tendência pró-oxidante da curcumina, encontramos o aumento significativo dos níveis de glutathione-S-transferase (GST) no grupo 500mg/Kg em comparação ao grupo controle (DMSO). A GST pertence a uma família multifuncional de proteínas envolvidas no processo de desintoxicação celular

e correção dos efeitos deletérios dos compostos xenobióticos. Essa enzima catalisa a conjugação da glutathiona reduzida (GSH) com compostos nocivos, a fim de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e excretados (Carletti *et al.*, 2008; Huber e Almeida, 2008). O grupo que recebeu 500mg/kg também apresentou maior proporção de Selênio (Se) em relação ao grupo controle. O Se é um mineral presente no sítio ativo da glutathiona peroxidase (GPx), enzima responsável pela conversão de peróxidos a compostos menos prejudiciais e a presença desse mineral na célula melhora a atividade de GPx e, portanto, reduz a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atuação de GPx é essencial para prevenir o ataque de radicais livres aos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares.

O tratamento com curcumina variou a taxa de armazenamento de glicogênio hepático de maneira dependente da dose. No grupo CUR-250, a reserva de glicogênio hepático foi significativamente maior do que no grupo controle. Resultado semelhante foi observado no trabalho de Bustanji e colaboradores (Bustanji *et al.* 2009). Esses autores relataram que o tratamento com curcumina (15, 30 e 60 mg/Kg por via i.p.) em camundongos Balb/c resultou em um aumento significativo nos estoques de glicogênio no fígado. Este aumento no glicogênio foi atribuído à ação inibitória da curcumina na glicogênio sintase quinase-3β (GSK-3β) que visa a glicogênio sintase (GS), uma enzima metabólica essencial na via de síntese de glicogênio (Bustanji *et al.* 2009; Kim *et al.* 2017). Segundo esses autores, após o tratamento, o GS não era fosforilado pelo GSK-3β e, portanto, estava ativo, o que aumentava a taxa de síntese de glicogênio no fígado. Porém, com o aumento da dose de curcumina, observamos que a reserva de glicogênio hepático no grupo CUR-500 não foi alterada em relação ao grupo controle, enquanto no grupo de maior dose (CUR-1000) houve depleção da reserva deste polissacarídeo. No grupo CUR-1000, também observamos um aumento na proporção dos sinusóides e, apesar das modificações na capilarização sinusoidal serem consideradas uma alteração patológica do fígado, por estarem envolvidas tanto em processos inflamatórios quanto no desenvolvimento de doenças como fibrose hepática e cirrose (B. Xu *et al.* 2003; Yao *et al.* 2013), inferimos que esse aumento nos sinusóides foi provavelmente devido à necessidade de um maior suprimento de nutrientes, como mecanismo protetor, para que essas células metabolizassem a alta dose de curcumina absorvida. Não observamos mudanças significativas nos demais parâmetros histológicos avaliados. O mesmo resultado foi encontrado por Granados-

Castro e colaboradores, que relataram que os animais tratados com curcumina (100mg/kg) apresentavam histologia hepática normal (Granados-Castro et al. 2016). Além disso, segundo os mesmos autores, a curcumina (100 mg/kg) atenuou o dano histológico do fígado induzido por paracetamol ao reduzir a área ocupada por células inflamatórias, reduzir hepatócitos necróticos e reduzir células hepáticas regenerativas (hepatócitos binucleados ou com núcleo muito grande).

## **5. CONCLUSÃO**

Diante do exposto, concluímos que a curcumina tem efeitos duplos no fígado de camundongas saudáveis. Quando administrada em doses baixas não leva a alterações hepáticas, diferentemente do que ocorre com o consumo de doses elevadas, onde observamos aumento os biomarcadores funcionais de lesão hepática, ação pró-oxidante com um perfil modulatório do estado oxidativo do fígado associado a biodisponibilidade de micro minerais, além de alterações na reserva de glicogênio.

## 6. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, v. 105 (1947), p. 121–126, 1984.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4 (6) p. 807–818, 2007.
- BALAJI, S.; CHEMPAKAM, B. Toxicity prediction of compounds from turmeric (*Curcuma longa* L). *Food and Chemical Toxicology*, v. 48 (10), p. 2951-2959, 2010.
- BARBAGALLO, M.; GUPTA, R. K.; BARDICEF, O.; BARDICEF, M.; RESNICK, L. M. Altered Ionic Effects of Insulin in Hypertension: Role of Basal I on Levels in Determining Cellular Responsiveness. **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 82 (6), p. 1761-1765, 1997.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, O. P.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23 (4), p. 629-643, 2010.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239 (1), p. 70-76, 1996.
- BETTGER, W. J.; O'DELL, B. L. Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4(4), p.194-207, 1993.
- BHATTACHARYA, P. T.; MISRA, S. R.; HUSSAIN, M. Nutritional aspects of essential trace elements in oral health and disease: an extensive review. **Scientifica**, v.1 p.12, 2016.
- BRAYTON, C. F. Dimethylsulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinarian**, v.76 (1), p. 76- 90, 1986.
- BUEGE, J. A.; AUST, A. D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Enzymology**, v. 52. p. 302–310, 1978.
- BUSTANJI, Y., TAHA, M. O., ALMASRI, I. M., AL-GHUSSEIN, M. A., MOHAMMAD, M. K., & ALKHATIB, H. S. Inhibition of glycogen synthase kinase by curcumin: Investigation by simulated molecular docking and subsequent in vitro/in vivo evaluation. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 24(3), p.771–778, 2009.
- CAO, J.; JIA, L.; ZHOU, H. M.; LIU, Y.; ZHONG, L. F. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells. **Toxicological**

**Sciences**, v. 91(2), p. 476–483, 2006.

CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BOCCIARELLI, T.; BOCCIO, P. D.; FEDERICI, L.; DI ILIO, C. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90 (1), p. 48-57, 2008.

CHAROENSUK, L.; PORNTIP, P.; PRAKOBWONG, S.; HIRAKU, Y.; LAOTHONG, U.; RUANG, J. W.; YONGVANIT, P.; SOMCHAI, P. Curcumin induces a nuclear factor-erythroid 2-related factor 2-driven response against oxidative and nitrative stress after praziquantel treatment in liver fluke-infected hamsters. **International Journal for Parasitology**, v. 41(6), p. 615-626, 2011.

CHENG, A. L.; HSU, C. H.; LIN, J. K.; HSU, M. M.; HO, Y. F.; SHEN, T. S.; KO, J. Y.; LIN, J. T.; LIN, B. R.; WU, M. S. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Res.** v.21, 2001.

CODEVILLA, C. F.; BARIN, J. S.; SILVA, C. B.; SILVA, T. M.; MENEZES, C. R. Incorporação da curcumina em sistemas nano estruturados: Revisão. *Ciência e Natureza*. **Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos**, v.37, (Ed Especial), p.152–163, 2015.

CONTRERAS-ZENTELLA, MARTHA LUCINDA, AND ROLANDO HERNÁNDEZ-MUÑOZ. Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress?. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 3529149, 2016.

COSTA, J. P.; LOURENÇO, N. V.; MENEZES, C. C.; SANTOS, P.; TOMÉ, A. R.; SOUSA, G. F. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 33 (3), p.421-8, 2012.

DESHPANDE S. S.; INGLE, A. D.; RASTE, A. S.; GADRE, S. G.; MARU, G. B. Subchronic oral toxicity of turmeric and ethanolic turmeric extract in female mice and rats. **Toxicology Letters**, v. 95(3), p.183-193, 1998.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101(1), p. 33-42, 2000.

FANG, J.; LU, J.; HOLMGREN, A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin a novel molecular mechanism for its anticancer activity. **Journal of Biology Chemical**, v. 280(1), p. 25284–25290, 2005.

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

- GIANNINI E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172 (3), p.367-379 2005.
- GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29 (1), p.302-307, 2015.
- GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B. B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. **The AAPS Journal**, v. 15(1), p. 195–218, 2013.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v.249(22), p. 7130-7139, 1974.
- HASSID, W. Z.; ABRAHAMS, S. Chemical procedures for analyses of polisaccharides. **Methods in enzymology**, v.3, p.34–51, 1957.
- HEWLINGS S. J.; KALMAN D. S. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods**, v. 6 (10), p.92, 2017.
- HOLDER, G. M.; PLUMMER, J. L.; RYAN, A. J. The Metabolism and Excretion of Curcumin (1,7-Bis-(4-hydroxy-3-ethoxyphenyl)-1,6-heptadiene- 3,s-dione) in the Rat. **Xenobiotica**, v. 8 (12), p.761-768, 1978.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31(5), p. 1170-1179, 2008.
- JAESCHKE, H.; GORES, G. J.; CEDERBAUM, A. I.; HINSON J. A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J. J. Mechanisms of Hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 65 (2), p. 166-176, 2002.
- KANG, YOUNG-JU; MI-JA CHOI. Liver Antioxidant Enzyme Activities Increase After Taurine in Ovariectomized Rats. **Advances in experimental medicine and biology** v. 975(2), p.1071–1080, 2017.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p.137–138, 1965.
- KIM, W.; FLAMM, S. L.; DI BISCEGLIE, A. M.; BODENHEIMER, H. C. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. **Hepatology**, v. 47(4), 1363–1370, 2008.
- KIM, S.; MCCLAVE, S. A.; MARTINDALE, R. G.; MILLER, K. R.; HURT, R. T. Hypoalbuminemia and Clinical Outcomes: What is the Mechanism behind the Relationship? **The American Surgeon** , v. 83 (11) , p. 1220 – 1227, 2017.

- KNUDSEN, A. R.; ANDERSEN, K. J.; HAMILTON-DUTOIT, S.; NYENGAARD, J. R.; MORTENSEN, F. V. Correlation between liver cell necrosis and circulating alanine aminotransferase after ischaemia/reperfusion injuries in the rat liver. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97(2), p. 133-138, 2016.
- LADEIRA, L. C. M.; SANTOS, E. C.; VALENTE, G. E.; SILVA, J.; SANTOS, T. A.; MALDONADO, I. R. S.C. Could Biological Tissue Preservation Methods Change Chemical Elements Proportion Measured by Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy ? **Biological Trace Element Research**, v.196, p. 168-172, 2019.
- LEE J. H.; OH, J. H.; LEE, Y. J. Biliary excretion of curcumin is mediated by multidrug resistance-associated protein 2. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35(5), p. 777–780, 2012.
- LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N. “Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins”, **Methods in Enzymology**, v.186, p.464-478, 1990.
- LIJU, V. B.; JEENA, K.; KUTTAN, R. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L.). **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p.52–61, 2013.
- LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37(3), p.293-303, 2001.
- LIU, Z.; QUE, S.; XU, J.; PENG, T. Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: a review. **International Journal Medical Sciences**, v. 11(9), p.925-35, 2014.
- LÓPEZ-LÁZARO, M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.52(1), p.103-127, 2008.
- MARCZYLO, T. H.; VERSCHOYLE, R. D.; COOKE, D. N.; MARAZZONI, P.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. **Cancer Chemother Pharmacol**, 60 (2), p. 171-178, 2007.
- MATEOS, R.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. **Journal of Chromatography**, v. 827(1), p.76–82, 2005.
- McNALLY, S. J.; HARRISON, E. M.; ROSS, J. A.; GARDEN, O. J.; WIGMORE, S. J. Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen

species, p38 activation and phosphatase inhibition. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 19(1), p.165–72, 2007.

MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances Experimental Medicine and Biology*, v. 595, p. 105-125, 2007.

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

NOVAES, R. D.; PENITENTE, A. R.; GONÇALVES R. V.; TALVANI, A.; PELUZIO, M. C.; NEVES, C. A.; NATALI, A. J.; MALDONADO, I. R. Trypanosoma cruzi infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 22(4), p. 270–279, 2013.

NOVAES, R. D.; GONÇALVES, R. V.; MARQUES, D. C.; CUPERTINO, M. DO C.; PELUZIO, M. DO C.; LEITE, J. P.; MALDONADO, I. R. Effect of Bark Extract of Bathysa cuspidata on Hepatic Oxidative Damage and Blood Glucose Kinetics in Rats Exposed to Paraquat. *Toxicologic Pathology*, v. 40, (1) p. 62–70, 2012.

O'DELL, B. L. Role of zinc in plasma membrane function. *The Journal of Nutrition*, v. 130 (5), 2000.

PALIPOCH, S.; PUNSAWAD, C.; KOOMHIN, P.; SUWANNALERT, P. Hepatoprotective effect of curcumin and alpha-tocopherol against cisplatin-induced oxidative stress. **BMC complementary and alternative medicine**, v.14, 2014.

PARK, E. J.; JEON, C. H.; KO, G.; KIM, J.; SOHN, D. H. Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, v. 52, p. 437- 440, 2000.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**, v. 32 (6), p.1053–1064, 2014.

QIU, P.; SUN, J.; MAN, S.; YANG, H.; MA, L.; YU, P.; GAO W. Curcumin Attenuates N-Nitrosodiethylamine-Induced Liver Injury in Mice by Utilizing the Method of Metabonomics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65(9), p. 2000-2007, 2017.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, H.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal*, v.22(3), p. 659-661, 2018.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess

- method. **Nitric oxide : biology and chemistry**, v. 6 (2), p. 178–185, 2002.
- RIVERA-ESPINOZA, Y.; MURIEL, P. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. **Liver International**, v. 29 (10), p.1457–1466, 2009.
- SAYED, M. M.; EL-KORDY, E. A. The protective effect of curcumin on paracetamol-induced liver damage in adult male rabbits: Biochemical and histological studies. **The Egyptian Journal of Histology**, v. 37(4), p. 629–639, 2014.
- SCHINONI, M. I. Fisiologia hepática. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 76 (1), p. 5-9, 2006.
- SHAO, W.; YU, Z.; CHIANG, Y.; YANG, Y.; CHAI, T.; FOLTZ, W.; LU, H.; FANTUS I. G.; JIN, T. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. **PLoS One** v.7(1), 28784, 2012.
- SLABBER, C. A.; GRIMMER, C. D.; ROBINSON, R. S. Solution Conformations of Curcumin in DMSO. *Journal of natural products* v.79(10) p.2726-2730, 2016.
- SOETAN, K. O.; OLAIYA, C. O.; OYEWOLE, O. E. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. **African Journal of Food Science**, v.4, p. 200-222, 2010.
- SOUZA, A. C. F.; MARCHESI, S. C.; LIMA, G. D. A.; NEVES, M. M. Effects of Arsenic Compounds on Microminerals Content and Antioxidant Enzyme Activities in Rat Liver. **Biological Trace Element Research**, v. 183, p. 305–313, 2018.
- SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G. P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; LIMA, M. E. F. Curcumina, o pó dourado do açafão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38 (4), 2015.
- TOKAÇ, M.; TANER, G.; AYDIN. S.; OZKARDES, A. B.; DUNDAR, H. Z.; TASLIPINAR, M. Y.; ARIKOK, A. T.; KILIÇ, M.; BASARAN, A. A.; BASARAN, N. Protective effects of curcumin against oxidative stress parameters and DNA damage in the livers and kidneys of rats with biliary obstruction. **Food and chemical toxicology**, v. 61, p. 28-35, 2013.
- VASCONCELOS, T. H. C.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS, H. B.; AGUIAR, F. B.; MOREIRA, P. V. L. Acute pre-clinical toxicological study with the hydroalcoholic extract of the leaves of *Cissussicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17 (4), p.583-591, 2007.
- VERA-RAMIREZ, L.; PÉREZ-LOPEZ, P.; VARELA-LOPEZ, A.; RAMIREZ-TORTOSA, M.; BATTINO, M.; QUILES, J. L. Curcumin and liver disease. **Bio Factors**, v. 39 (1), p. 88–100, 2013.
- VINCENT, K. H.; INNES, K. E.; VINCENT, R. K.; Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes, obesity and metabolism*, v. 9 (6), p. 813-839, 2007.

- XU, B.; BROOME, U.; UZUNEL, M.; NAVA, S.; GE, X. KUMAGAI-BRAESCH, M.; HULTENBY, K.; CHRISTENSSON, B.; ERICZON, B. G.; HOLGERSSON, J.; SUMITRAN-HOLGERSSON, S. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. **American Journal of Pathology**, v. 163 (4), p.1275-1289, 2003.
- YAO, Q.; LIN, Y.; LI, X.; SHEN, X.; WANG, J.; TU, C. Curcumin ameliorates intrahepatic angiogenesis and capillarization of the sinusoids in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. **Toxicology Letters**, v. 222 (1), p.72-82, 2013.
- ZHAO, H.-L.; SONG, C. H.; CHAI, O. H. Negative Effects of Curcumin on Liver Injury Induced by Alcohol. **Phytotherapy Research**, 26(12):1857–1863, 2012.

## 5. CAPÍTULO 2

---

### EFEITOS DA CURCUMINA NOS PARAMETROS REPRODUTIVOS DE CAMUNDONGAS SWISS

Talita Amorim Santos<sup>1</sup>, Janaína da Silva<sup>1</sup>, Luiz Carlos Maia Ladeira<sup>1</sup>, Mariana Machado Neves e Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> - Laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa

#### RESUMO

A curcumina, o curcuminoide mais abundante de *Curcuma longa L.*, possui inúmeros estudos conflitantes ilustrando os seus efeitos benéficos e/ou prejudiciais sobre o potencial reprodutivo. Entretanto, seu impacto nos ovários e nos parâmetros de fertilidade ainda tem muito a ser elucidado em camundongos saudáveis. Assim sendo, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da curcumina no ovário e fertilidade de camundongas Swiss. Para isso, três experimentos (Exp.1, Exp.2 e Exp.3) foram realizados utilizando camundongos Swiss adultos. Cada experimento foi composto por quatro grupos, sendo estes: grupo veículo, que recebeu 0,2ml de dimetilsulfóxido (DMSO) por animal, e três grupos que receberam curcumina pura natural diluída em DMSO. Os grupos que receberam curcumina consistiram em: grupo CUR-250 que recebeu 250mg/Kg, o grupo CUR-500 que recebeu 500mg/Kg e o grupo CUR-1000 que recebeu 1000mg/Kg de peso corporal. A administração do DMSO ou da curcumina foi feita por via oral. As fêmeas do Exp.1 foram tratadas com DMSO ou curcumina durante 28 dias consecutivos e no 29º dia foram eutanasiadas. Nesses animais foram avaliados o efeito da curcumina no ciclo estral e ovário. Os Exp.2 e 3 foram realizados para avaliar o efeito da curcumina na fertilidade das camundongas. No Exp.2 as fêmeas receberam o tratamento por 28 dias consecutivos e após vinte e quatro horas do último tratamento, foram colocadas para acasalar e seguir com a gestação. Já as fêmeas do Exp.3 receberam o tratamento durante todo o período de acasalamento e gestação. As fêmeas do Exp.2 e 3 foram eutanasiadas no 19º dia após a confirmação da cópula. As análises consistiram na avaliação do ciclo estral,

frequência de folículos ovarianos, quantificação das regiões argentafins organizadoras de nucléolo (AgNORs) em células da granulosa e parâmetros de fertilidade. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com curcumina em camundongas nulíparas provocou irregularidades no ciclo estral e redução da atividade proliferativa em células da granulosa de folículos secundários. Já a análise de fertilidade mostrou que o pré-tratamento com curcumina na dose de 1000mg/kg/PC reduziu em 50% o índice de prenhez, e que a exposição a curcumina durante o acasalamento e gestação acarretou em redução drástica na taxa de prenhez e aumento da perda pré-implantação em todas as três doses administradas. Embasados nesses resultados, concluímos que em camundongas saudáveis a curcumina tem efeito contraceptivo, principalmente quando consumida no período do acasalamento.

**Palavras-chave:** células da granulosa, potencial de fertilidade e perda pré-implantação.

## 1. INTRODUÇÃO

Curcumina, um polifenol hidrofóbico encontrado no rizoma da cúrcuma (*Curcuma longa*), é comumente utilizada como tempero, em corantes alimentares, e na fitoterapia tradicional (Prasad *et al.*, 2014). Essa molécula possui característica pleiotrópica, ou seja, possui capacidade de atuar em inúmeros alvos celulares e vários mecanismos de ação, que incluem alteração na atividade de enzimas e modulação de fatores de crescimento (Prasad *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2015). Seus benefícios para a saúde compreendem suas atividades antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e antiangiogênica todas elas bem documentadas na literatura (Fan *et al.*, 2013; Aggarwa e Harikumar, 2009; Gupta *et al.*, 2013; Stanić, 2017). Curcumina também tem se demonstrado ser um potente agente anticancerígeno devido a sua capacidade de inibir a divisão celular e induzir a morte celular de vários tipos de células cancerosas, mesmo aquelas resistentes a outros tipos de tratamento (Piwocka *et al.*, 2002; Bielak-Zmijewska *et al.*, 2004; Magalska *et al.*, 2006; Mosieniak *et al.*, 2006; Reuter *et al.*, 2008).

Efeitos benéficos da curcumina para os ovários têm sido confirmados por diversos pesquisadores. Por exemplo, curcumina tem sido relatada por proteger as células ovarianas e promover a foliculogênese em camundongas acometidas por estresse induzido pela regulação negativa dos receptores de FSH (Tiwari-Pandey e Ram Sairam, 2009), lesão por isquemia-reperfusão (Sak *et al.*, 2013) e radiação ionizante (Aktas *et al.*, 2012). Além disso, a administração dietética de curcumina inibiu o estresse oxidativo e a apoptose em camundongas com falência ovariana prematura (FOP) (Yan *et al.*, 2018).

No entanto, efeitos contraditórios da curcumina na reprodução também tem sido relatado. De acordo com Murphy e colaboradores (2012), a curcumina suprime a foliculogênese ovariana de ratas, maturação sexual e fecundidade, sugerindo que esse polifenol afeta sistemas reprodutivos saudáveis. Segundo Kádasi e colaboradores (2017), a adição da curcumina em um sistema *in vitro* diminuiu significativamente o acúmulo de marcadores de proliferação e a expressão de seus RNAm em células da granulosa de ovários de porcas. Bielak-Zmijewska e colaboradores (2010) observaram que a curcumina compromete a retomada da

meiose de oócitos e inibe as divisões meióticas e mitóticas em camundongas. Chen e Chan (2012) relataram que, *in vitro*, a curcumina inibe a maturação de ovócitos de ratas Wistar e também promove efeitos prejudiciais sobre a fertilização *in vitro* e os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário *in vivo*. Chen e colaboradores (2010) também demonstraram que, *in vitro*, a exposição de blastocisto de ratos à curcumina desencadeia a apoptose de células embrionárias.

O efeito prejudicial da curcumina também abrange células reprodutoras masculinas. Naz (2011) mostrou em seu estudo que o contato de espermatozoides murinos com curcumina reduz a motilidade, capacitação e reação acrossômica dessas células. Redução da motilidade, viabilidade espermática e do potencial de fertilização também foi atribuída à curcumina no estudo de Moshari e colaboradores (2017).

Apesar dos relatos citados, os efeitos da curcumina nos ovários e parâmetros de fertilidade ainda são pouco conhecidos em camundongas. Diante disso, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o efeito de três doses de curcumina sobre a reprodução de camundongas Swiss adultas saudáveis.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Nesse estudo foram utilizados 120 camundongos *Swiss* (88 fêmeas e 32 machos) adultos, com 90 dias de idade, pesando  $32,2 \pm 2,4\text{g}$  (fêmeas) e  $41,1 \pm 1,9\text{g}$  (machos) (média  $\pm$  desvio padrão), todos obtidos no Biotério Central e mantidos no Biotério Experimental do Departamento de Biologia Geral, ambos da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, mantidos sob condições controladas de luminosidade (ciclos de 12/12 horas claro/escuro), temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa do ar (45% a 55%) e com acesso a ração e água *ad libitum*. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) e registrado sob o protocolo nº 555/2016.

## 2.2 Delineamento experimental

Após 15 dias de aclimação, os animais foram divididos aleatoriamente em três experimentos. Cada experimento foi composto por quatro grupos, sendo estes: grupo veículo, que recebeu 0,2ml de dimetilsulfóxido (DMSO) por animal, e três grupos que receberam curcumina pura natural (VETEC - Lote: DCBD5305V) diluída em DMSO, onde o grupo CUR-250 recebeu 250mg/Kg, o grupo CUR-500 recebeu 500mg/Kg e o grupo CUR-1000 recebeu 1000mg/Kg de peso corporal. O DMSO foi escolhido como veículo devido a curcumina possuir baixa solubilidade em água (anand *et al.*,2007), o que torna necessária a utilização de um solvente hidrofóbico. Além disso, o DMSO é considerado um solvente orgânico não tóxico com intensa capacidade de penetração nas membranas biológicas (Brayton, 1986; Slabber *et al.*, 2016). Nos três experimentos as administrações foram feitas via gavagem e cada animal recebeu um volume de 0,2ml por dia de tratamento. O desenho experimental está elucidado na figura 1.

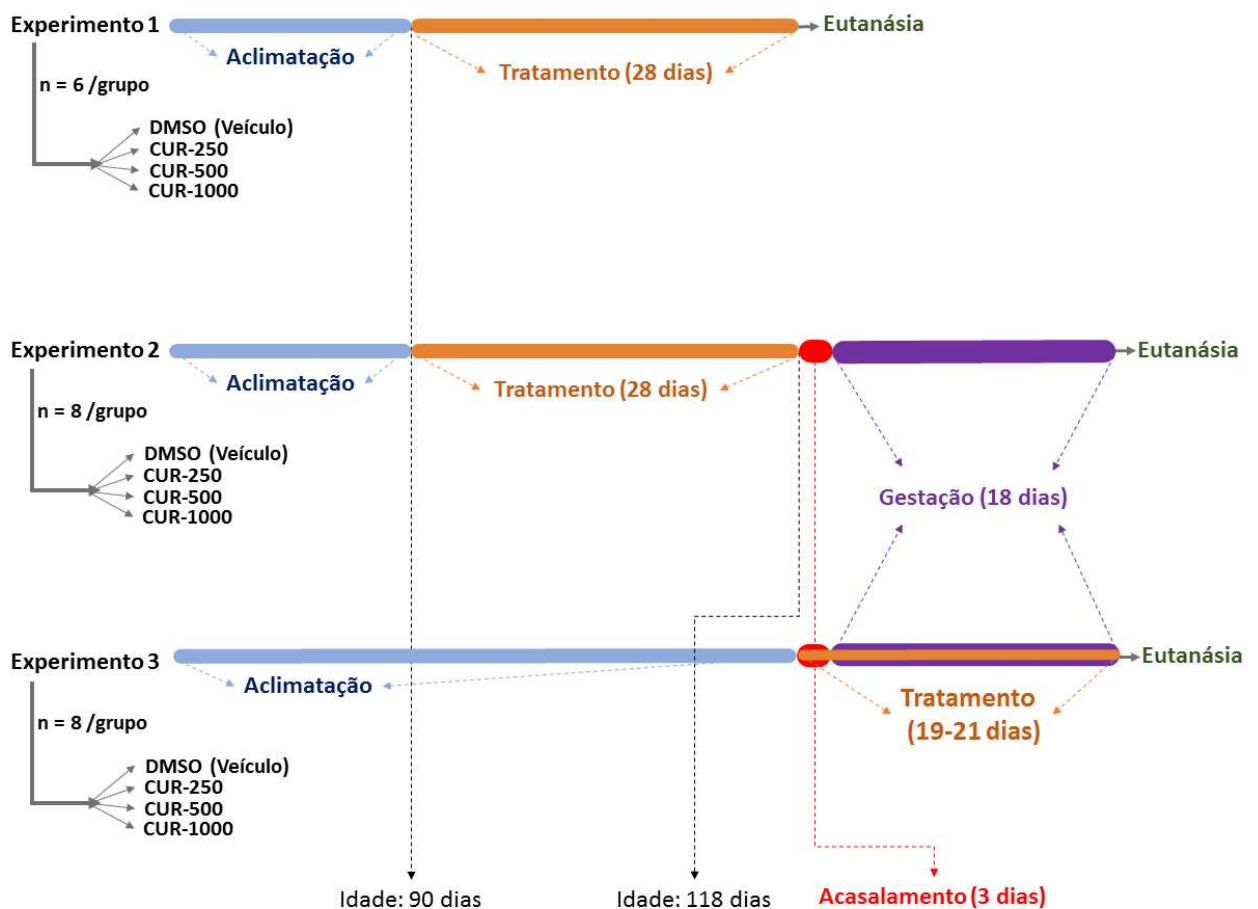


Figura 1. Delineamento experimental

## **2.3 Experimento 1**

O experimento 1 (Exp.1) foi realizado para avaliar o efeito da curcumina no ciclo estral e ovário de camundongas nulíparas. Para isso, 24 camundongas (6 animais por grupo) com 90 dias de idade foram tratados por 28 dias consecutivos e eunatanásias no 29º dia (Figura 1).

### **2.3.1 Análise do ciclo estral**

Para assegurar que todas as fêmeas do Exp.1 apresentavam regularidade no ciclo estral no início do tratamento, após 15 dias de aclimatação foi realizado o monitoramento do ciclo estral durante os 15 dias anteriores ao início do tratamento. Apenas as fêmeas com ciclos estrais regulares foram selecionadas para receber os tratamentos (DMSO e Curcumina). O monitoramento do ciclo estral de cada fêmea, antes e durante todo o período de tratamento, foi realizado por meio do esfregaço vaginal que foi feito diariamente sempre pela manhã entre 8 e 9h. Para isso, foi utilizado uma haste com algodão umedecida em solução fisiológica. O material coletado foi depositado em lâmina histológica, corada com o Kit Panótico Rápido (Laborclin) e analisada sob microscópio óptico.

A determinação do estágio do ciclo estral foi realizada de acordo com os seguintes critérios citológicos: estro – predominância de células epiteliais cornificadas, metaestro – presença de células epiteliais cornificadas e leucócitos polimorfonucleares, diestro – predominância de leucócitos polimorfonucleares, proestro – predominância de células epiteliais nucleadas (Byers *et al.*, 2012). Considerou-se fêmeas com ciclos regulares as que apresentaram: diestro por um período máximo de 3 dias consecutivos, proestro por no máximo 1 dia, estro por no máximo 3 dias consecutivos e metaestro por no máximo 1 dia (Wallace *et al.*, 2018).

### **2.3.2 Eutanásia, coleta de material biológico, análises biométricas e processamento histológico**

Após 24 horas do último tratamento (29º dia), os animais foram pesados, anestesiados (quetamina 150mg/kg/ip e xilazina 10mg/kg/ip) e submetidos a eutanásia por exsanguinação através da punção cardíaca. Os ovários foram removidos, dissecados, pesados em balança analítica e imersos em solução fixadora

Karnovsky por 24h (Karnovsky, 1965). Posteriormente foram desidratados em série etanólica crescente e incluídos em historesina (Leica ®). Secções de 3µm de espessura com intervalos de 45µm foram obtidas utilizando-se micrótomo rotativo semiautomático (Leica ® RM2255) e navalhas de vidro. As secções histológicas utilizadas para as análises morfológicas e morfométricas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e montadas com o meio de montagem Entellan® (Merck, Frankfurt, Germany). Já as secções histológicas utilizadas para a quantificação das regiões argentafins organizadoras de nucléolo (AgNORs) foram coradas com solução coloidal de prata. Esta solução foi preparada com a mistura da solução A (5g de nitrato de prata em 10ml de água destilada) com a solução B (500mg de gelatina em 25 ml de água destilada com 0,25ml de ácido fórmico) na proporção de 2:1. A incubação foi feita em ambiente úmido e escuro a 37°C por 30 minutos.

### **2.3.3 Frequência de folículos ovarianos e corpos lúteos**

Com a utilização de um microscópio (Olympus, CX 40, Tokyo, Japan) foi realizada a quantificação do número total de folículos primários, secundários, pré-antrais, antrais, atrésicos e corpos lúteos em dez secções histológicas do ovário esquerdo das fêmeas do Exp.1. A classificação histológica dos folículos ovarianos foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos por Freeman (1994), ou seja: folículo primordial: ovócito circundado por uma única camada de células foliculares achatadas; folículo primário: ovócito circundado por uma camada de células foliculares cubicas; folículo secundário: ovócito circundado por várias camadas de células da granulosa e da teca; folículo pré-antral: ovócito circundado por várias camadas de células da granulosa e com início da formação do antro; folículo antral: ovócito excêntrico, circundado pela *corona radiata* e contido pelo *cumulus ooforus* e antro folicular amplo; folículo atrésico: ovócito degenerado e/ou circundado de células da granulosa com núcleos fragmentados ou picnóticos.

### **2.3.4 Quantificação das AgNORs**

Nas secções histológicas coradas pela prata, foram quantificadas as AgNORs presentes no núcleo de 60 células da granulosa de folículos secundários com 2-3 camadas e de folículos secundários com 5 ou mais camadas (Silva *et al.*, 2003). Para

cada animal, foram utilizados cinco folículos com 2-3 camadas de células da granulosa (CCG) e cinco folículos com 5 ou mais CCG. Somente foram incluídas na contagem as AgNORs que se encontravam individualizadas com pontos pretos ou marrons. Quando estas apresentavam-se agrupadas foram registradas como uma única AgNOR, conforme descrição na literatura (Crocker *et al.*, 1989). A contagem das AgNORs foi realizada em imagens digitais obtidas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX -53, Tokyo, Japan) com objetiva de 40x e Zoom 2x equipado com uma câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan). A quantificação das AgNORs foi realizada com auxílio do software Image J 1.48v (National Institute of Health, USA).

## **2.4 Experimentos 2 e 3**

Os experimentos 2 (Exp.2) e 3 (Exp.3) foram realizados para avaliar ação da curcumina na fertilidade. Em ambos os experimentos, foram utilizados oito animais por grupo. As camundongas dos Exp.2 (com 90 dias de idade) receberam o tratamento durante 28 dias consecutivos, após esse período, os animais foram colocados para acasalar por três dias consecutivos. Durante o acasalamento e gestação as fêmeas do Exp. 2 não receberam tratamento. Já as camundongas do Exp.3 receberam o tratamento apenas durante o período de acasalamento e gestação. As camundongas dos Exp.2 e 3 iniciaram o acasalamento com 118 dias de idade e foram eutanasiadas no 19º dia após a confirmação da cópula (Figura 1). Os machos utilizados para acasalar nos Exp. 2 e 3 não receberam tratamento em nenhum momento.

### **2.4.3 Acasalamento natural**

O acasalamento natural dos animais dos Exp.2 e 3 ocorreu com a presença do macho por um período de 72 horas, obedecendo a proporção de um macho para duas fêmeas por gaiola. Após esse período os machos foram separados das fêmeas. A presença de espermatozoides no esfregaço vaginal realizado em cada fêmea nos períodos de 24, 48 e 72 horas de acasalamento foi utilizada para confirmar a cópula e estabelecer o dia 0 de gestação.

#### **2.4.2 Eutanásia, coleta de material biológico, análises biométricas e processamento histológico.**

No 18º dia de gestação as fêmeas dos Exp. 2 e 3 foram eutanasiadas seguindo os mesmos procedimentos adotados no Exp. 1. Útero e ovários foram removidos, dissecados e pesados em balança analítica. Os cornos uterinos provenientes das fêmeas gestantes foram abertos para quantificação de áreas de implantação, número de reabsorções, fetos viáveis e não viáveis. Foram considerados fetos viáveis os animais que não apresentaram malformações estruturais e anomalias esqueléticas (Hood, 2012).

Os ovários foram imersos em solução fixadora Karnovsky por 24h (Karnovsky, 1965), desidratados em série etanólica crescente e incluídos em historesina (Leica®). Posteriormente, secções seriadas de 3µm de espessura com intervalos de 45µm foram obtidas utilizando-se um micrótomo rotativo semiautomático (Leica® RM2255) e navalhas de vidro. Os dois ovários, de cada camundonga, foram cortados do início ao fim para que todos os corpos lúteos fossem observados e contados. As secções histológicas obtidas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e montadas com o meio de montagem Entellan® (Merck, Frankfurt, Germany).

#### **2.4.3 Análise de Fertilidade**

Foram determinados os seguintes índices de fertilidade: índice de acasalamento feminino ( $n^\circ$  de fêmeas com espermatozoides presentes no esfregaço vaginal /  $n^\circ$  de fêmeas usadas no acasalamento x100); índice de acasalamento masculino ( $n^\circ$  de machos com espermatozoides presentes no esfregaço vaginal /  $n^\circ$  de machos usados no acasalamento x100); índice de prenhez: ( $n^\circ$  de fêmeas prenhes /  $n^\circ$  de fêmeas com espermatozoides presentes no esfregaço vaginal x 100); potencial de fertilidade (sítios de implantação/  $n^\circ$  de corpos lúteos x 100); taxa de perda de pré-implantação ( $n^\circ$  de corpos lúteos - número de implantações /  $n^\circ$  de corpos lúteos x 100) e taxa de perda pós-implantação ( $n^\circ$  de implantação - número de fetos viáveis /  $n^\circ$  de implantações x 100) (Hood, 2012).

## 2.5 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Nos dados que, segundo esse teste, apresentaram uma distribuição normal foram realizadas a análise de variância ANOVA “one-way” seguida pelo teste de Holm-Sidak, com exceção dos resultados da quantificação das AgNORs entre os dois tipos de folículos secundários que foi utilizado o teste t de student. Já os dados que não apresentaram uma distribuição normal foram analisados pelo teste Kruskal-Walis seguido pelo teste de Dunns. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (média  $\pm$  DP). A significância estatística foi estabelecida como  $p \leq 0,05$ . Todas as análises foram feitas no software GraphPad Prism 6.0.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Parâmetros biométricos

Os parâmetros biométricos das fêmeas nulíparas (Exp.1) não foram alterados com o consumo das diferentes doses de curcumina administradas em relação ao grupo que recebeu o veículo (DMSO). A Tabela 1 apresenta os resultados das análises biométricas.

**Tabela 1.** Parâmetros biométricos de camundongas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina durante um período de 28 dias.

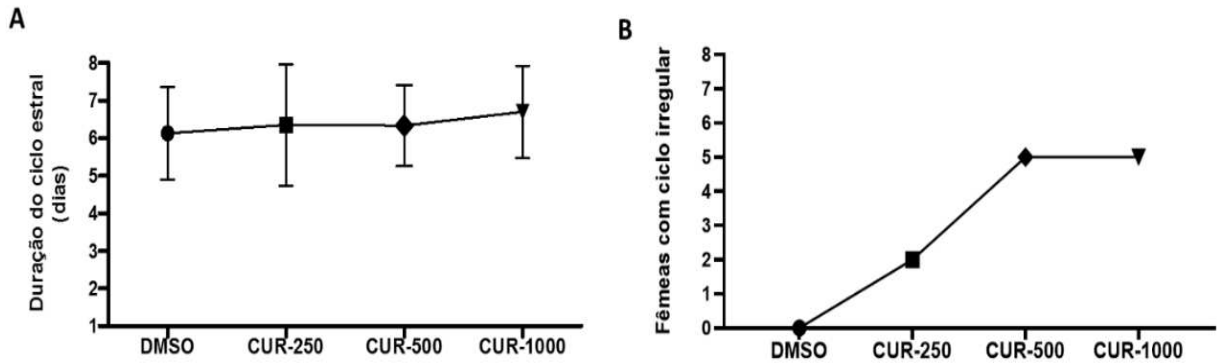
	Exp. 1			
	DMSO	CUR-250	CUR-500	CUR-1000
Peso Corporal Inicial (g)	32,2 $\pm$ 3,4	30,4 $\pm$ 1,9	32,1 $\pm$ 3,1	31,3 $\pm$ 2,8
Peso Corporal Final (g)	31,7 $\pm$ 1,7	30,1 $\pm$ 1,3	32,5 $\pm$ 2,5	33,2 $\pm$ 3,2
Varição do Peso Corporal (g)*	- 0,4 $\pm$ 2,5	- 0,3 $\pm$ 1,4	0,4 $\pm$ 2,4	1,9 $\pm$ 1,5
Peso do Ovário (g)	0,003 $\pm$ 0,002	0,004 $\pm$ 0,001	0,004 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,001

Média $\pm$ DP. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0,05$ , n = 6. \*Diferença entre o peso corporal inicial e final.

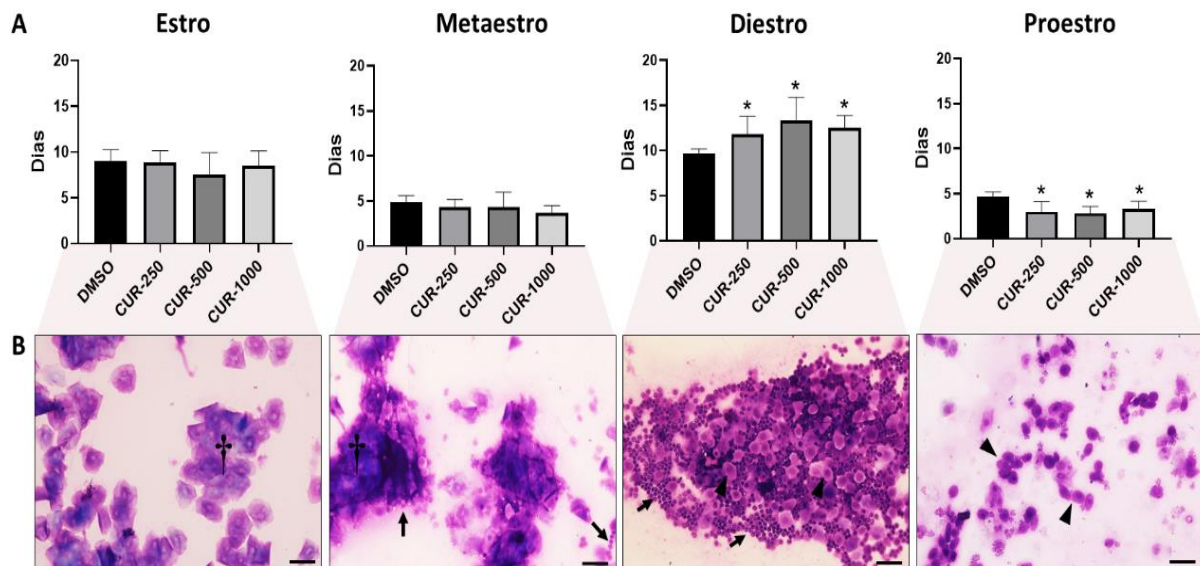
### 3.2 Avaliação do ciclo estral

Embora o tratamento com a curcumina não tenha interferido significativamente na duração total (em dias) do ciclo estral das camundongas nulíparas (Figura 2. A), ela provocou alterações na duração de alguns estágios que consequentemente levou a irregularidades no ciclo reprodutivo (Figura 2.B). Nos

grupos CUR-500 e CUR-1000 o diestro foi prolongado e nos três grupos que receberam a curcumina o proestro foi reduzido (Figura 3. A e B).



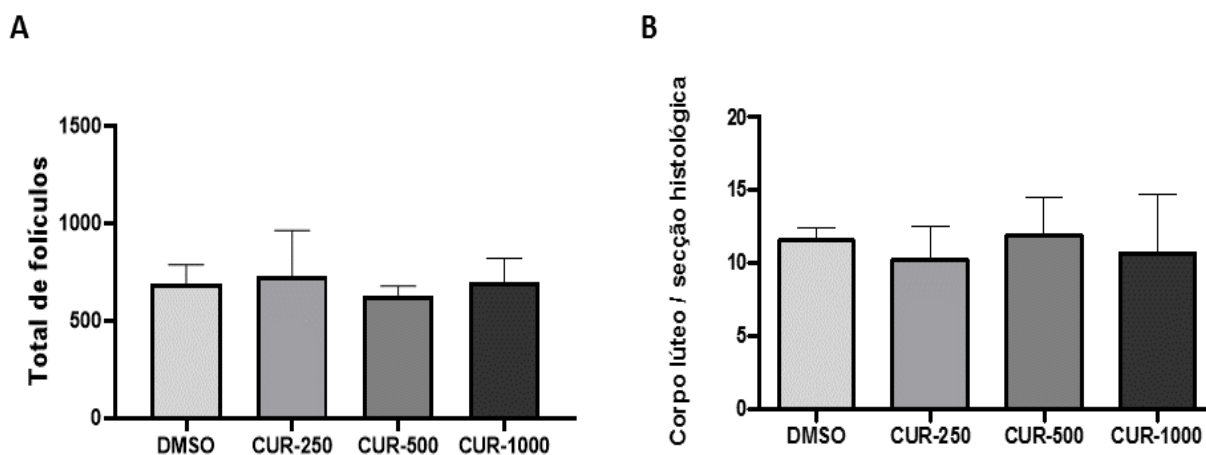
**Figura 2.** Avaliação do ciclo estral de camundongas nulíparas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. **A.** Duração (em dias) do ciclo estral das camundongas do Exp.1. (Média  $\pm$  DP). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ ,  $n = 6$ . **B.** Número de fêmeas com ciclo irregulares.



**Figura 3.** Estágios do ciclo estral das camundongas nulíparas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. **A.** Ocorrências dos estágios dos ciclos (Média  $\pm$  DP). Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ ,  $n = 6$ . **B.** Fotomicrografias representativas de esfregaço vaginal apresentando as quatro fases do ciclo estral de camundongas. (+) Células epiteliais queratinizadas; (→) Leucócitos polimorfonucleares; (▶) Células epiteliais nucleadas. Barra: 50µm. \*Diferente do DMSO.

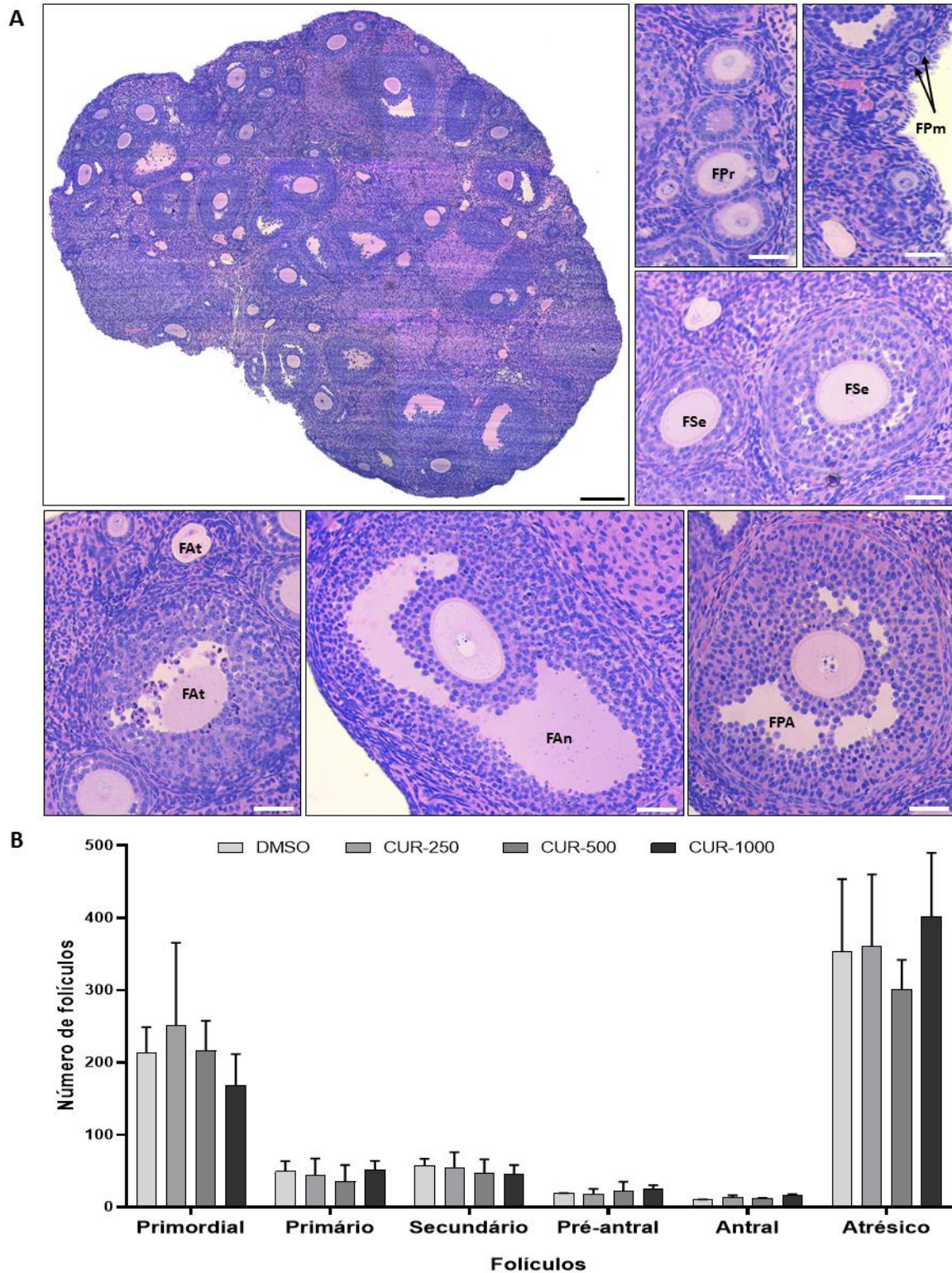
### 3.3 Frequência de folículos ovarianos e corpos lúteos

O total de folículos ovarianos (Figura 4.A) e a proporção de corpos lúteos (Figura 4.B) no ovário das camundongas nulíparas não foram alterados com a administração da curcumina.



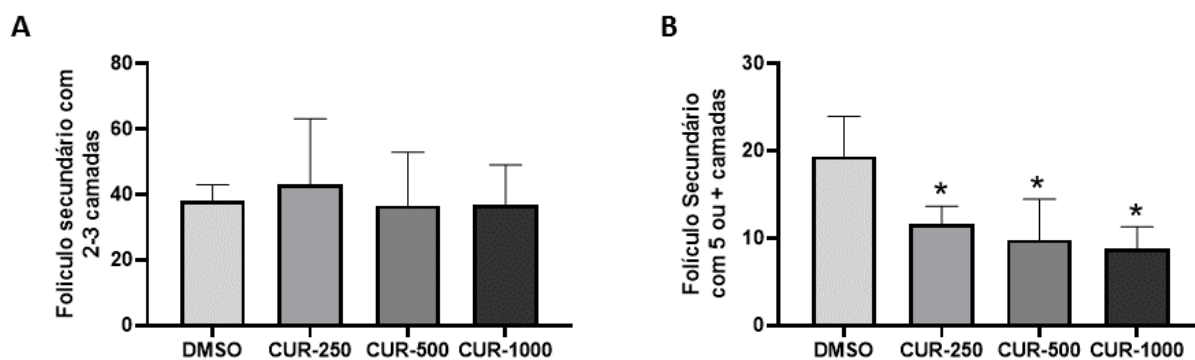
**Figura 4.** Frequência de folículos ovarianos e corpos lúteos em camundongas nulíparas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina por 28 dias. **A.** Total de folículos ovarianos por secção histológica do ovário. **B.** Total de corpos lúteos por secção histológica do ovário. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ , Média  $\pm$  DP,  $n = 6$ .

Ao analisarmos a população de cada tipo de folículo, observamos que o tratamento com a curcumina não alterou a frequência de folículos primários, secundários, pré-antrais, antrais e atresícos nos ovários das camundongas nulíparas (Figura 5 A e B).



**Figura 5. A)** Fotomicrografias representativas de seções histológicas do ovário de camundongas nulíparas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. (FPm) Folículo Primordial; (FPr) Folículo Primário; (FSe) Folículo Secundário; (FPA) Folículo Pré-Antral; (FAn) Folículo Antral; (FAtr) Folículo Atrésico. Barra preta: 200 $\mu$ m; Barra branca: 50 $\mu$ m. Coloração HE. **B)** Frequência de folículos ovarianos (Média  $\pm$  DP). Os dados foram analisados por ANOVA "one-way" seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ ,  $n = 6$ .

A quantidade de folículo secundário com duas a três camadas de células da granulosa também não apresentou diferença significativa em relação ao grupo que recebeu o DMSO (Figura 6.A), mas o número de folículos secundários com cinco ou mais camadas de células da granulosa foi estatisticamente reduzido nos três grupos que receberam curcumina (Figura 6.B).

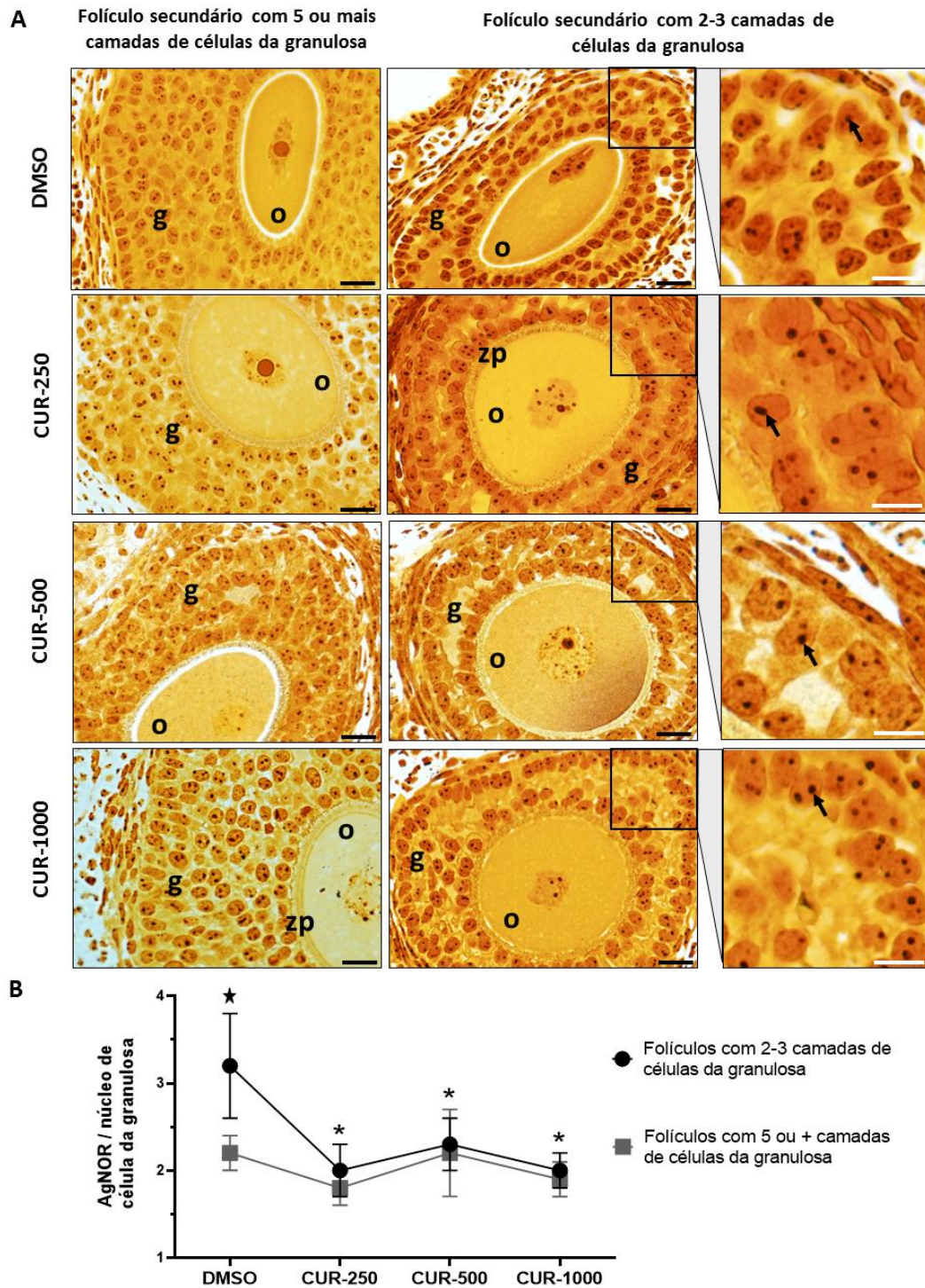


**Figura 6.** **A.** Frequência de folículos secundários com 2-3 camadas de células da granulosa de camundongos tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. **B.** Frequência folículos secundários com 5 ou mais camadas de células da granulosa de camundongos tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ , Média  $\pm$  DP,  $n = 6$ . \*Diferente do DMSO.

### 3.4 Quantificação de AgNORs em células da granulosa

No grupo que recebeu o DMSO os folículos com 2-3 camadas de células da granulosa (CCG) apresentaram maior quantidade de AgNORs no núcleo das células da granulosa do que os folículos secundários com 5 ou mais CCG (Figura 7). Porém, essa diferença na quantidade de AgNORs entre os dois tipos de folículos secundários não foi observada nos grupos tratados com a curcumina, onde o número de AgNORs presentes no núcleo das células da granulosa foi estatisticamente igual em ambos os folículos secundários (Figura 7).

Também identificamos que todos os grupos que receberam curcumina apresentaram menor quantidade de AgNORs no núcleo das células da granulosa dos folículos secundários com 2-3 CCG, em relação ao grupo que recebeu o DMSO (Figura 7).



**Figura 7.** Quantificação de AgNORs em células da granulosa de camundongas nulíparas tratadas com DMSO (veículo) e diferentes doses de curcumina. **A)** Fotomicrografia de folículos secundários de camundongas tratadas com diferentes doses de curcumina apresentando regiões organizadoras de nucléolo argentafins (AgNORs). (g) granulosa, (o) oócito, (zp) zona pelúcida; (seta) AgNOR. Barra preta: 10 $\mu$ m; barra branca: 5 $\mu$ m. **B)** Número médio de AgNORs no núcleo das células da granulosa de folículos secundários nos ovários de camundongas. Os dados foram analisados pelo teste t de student (comparação entre os tipos de folículos) e por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak (comparação entre os grupos) considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ . (Média  $\pm$  DP).  $\star$  diferença estatística entre folículos com 2-3 e 5 ou + camadas; \* diferença estatística em relação ao DMSO (para os folículos com 2-3 camadas).

### 3.5 Análise de fertilidade

As camundongas que receberam curcumina por 28 dias antes do acasalamento (Exp.2) não apresentaram alterações significativas nos parâmetros de fertilidade avaliados (Tabela 2 e Figura 8). Porém, foi observada redução de 50% do índice de prenhez no grupo que recebeu a maior dose de curcumina (CUR-1000) (Figura 8.E). No entanto, os animais que receberam curcumina durante os períodos de acasalamento e gestação (Exp. 3) apresentaram redução significativa na taxa de perda pré-implantação e no potencial de fertilidade (Tabela 3 e Figura 9.F). Além disso, nos animais do Exp.3, o índice de prenhez foi drasticamente reduzido no grupo que recebeu curcumina, principalmente no grupo que recebeu a maior dose desse composto, no qual nenhuma das camundongas engravidaram (Figura 9.E).

**Tabela 2.** Índices de fertilidade de camundongas adultas tratadas com DMSO (veículo) e curcumina por 28 dias antes do acasalamento.

Parâmetros	Exp.2			
	DMSO	CUR-250	CUR-500	CUR-1000
Número de fêmeas	8	8	8	8
Número de machos	4	4	4	4
Número de fêmeas acasaladas	8	8	8	8
Número de machos acasalados	4	4	4	4
Índice de fêmeas acasaladas (%)	100	100	100	100
Índice de machos acasalados (%)	100	100	100	100
Número de fêmeas prenhas	7	6	7	4
Peso do ovário (g) <sup>1</sup>	0,007 ± 0,002	0,007 ± 0,002	0,009 ± 0,002	0,006 ± 0,002
Número de corpo lúteo <sup>1</sup>	17,4 ± 13,8	16,1 ± 9,7	20,8 ± 21,2	29,6 ± 19,8
Número de implantações <sup>1</sup>	9,8 ± 5,0	8,8 ± 5,5	10,5 ± 4,5	5,4 ± 5,9
Número de fetos viáveis <sup>1</sup>	9,4 ± 2,4	10,3 ± 1,4	11,6 ± 1,9	10,0 ± 2,9
Perda pré-implantação (%) <sup>1</sup>	23,5 ± 33,7	30,9 ± 43,1	20,1 ± 34,2	53,3 ± 50,2
Perda pós-implantação (%) <sup>1</sup>	14,0 ± 10,6	11,3 ± 10,3	5,0 ± 7,1	8,3 ± 16,7

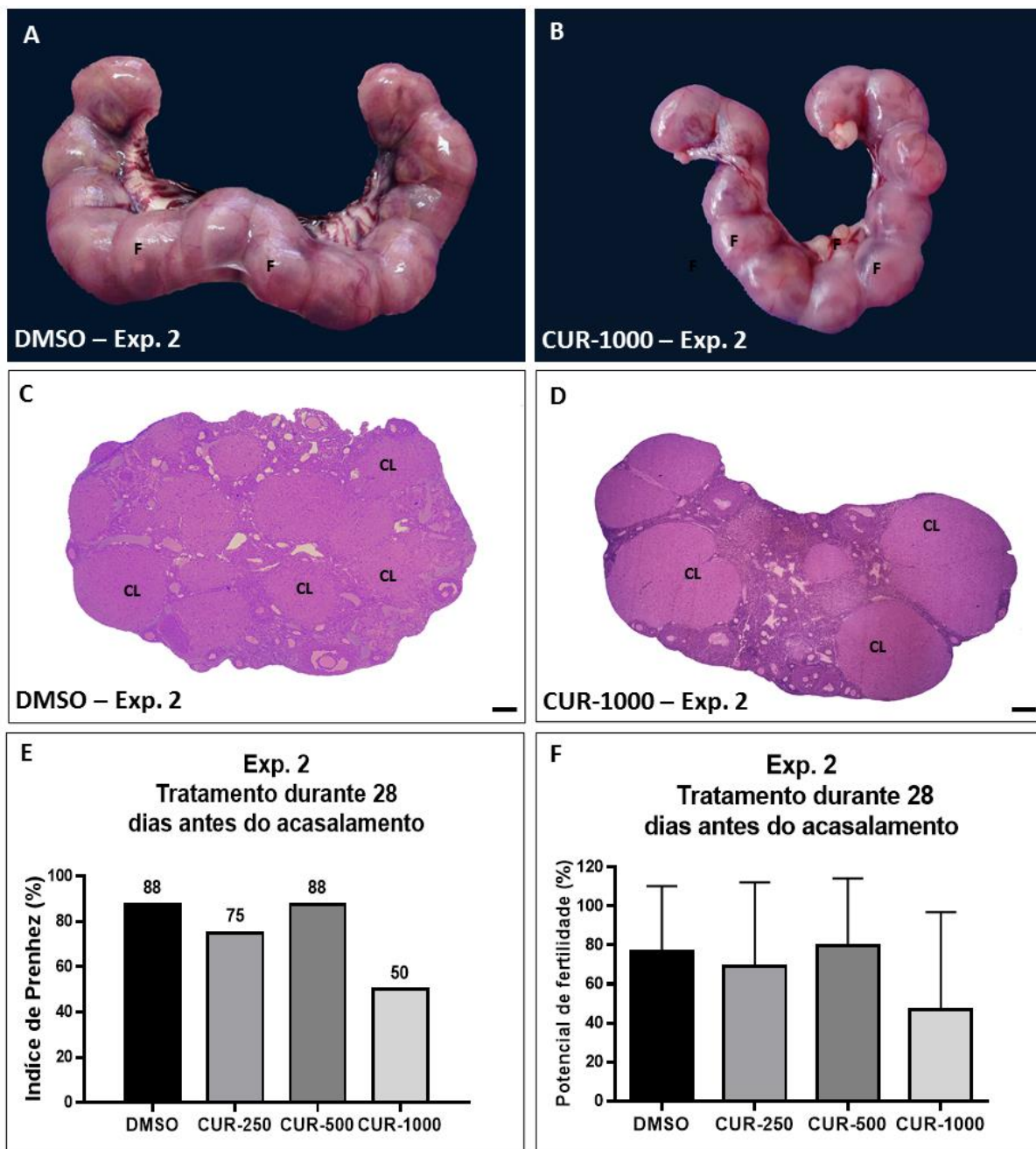
Média ± DP. <sup>1</sup>Os dados foram analisados por ANOVA "one-way" seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ . (Média ± DP).

**Tabela 3.** Índices de fertilidade de camundongas adultas tratadas com DMSO (veículo) e curcumina durante os períodos de acasalamento e gestação.

Parâmetros	Exp.3			
	DMSO	CUR-250	CUR-500	CUR-1000
Número de fêmeas	8	8	8	8
Número de machos	4	4	4	4
Número de fêmeas acasaladas	8	8	8	8
Número de machos acasalados	4	4	4	4
Índice de fêmeas acasaladas (%)	100	100	100	100
Índice de machos acasaladas (%)	100	100	100	100
Número de fêmeas prenhas	6	1	2	0
Peso do ovário (g) <sup>1</sup>	0,006 ± 0,002	0,004 ± 0,001	0,006 ± 0,002	0,005 ± 0,001

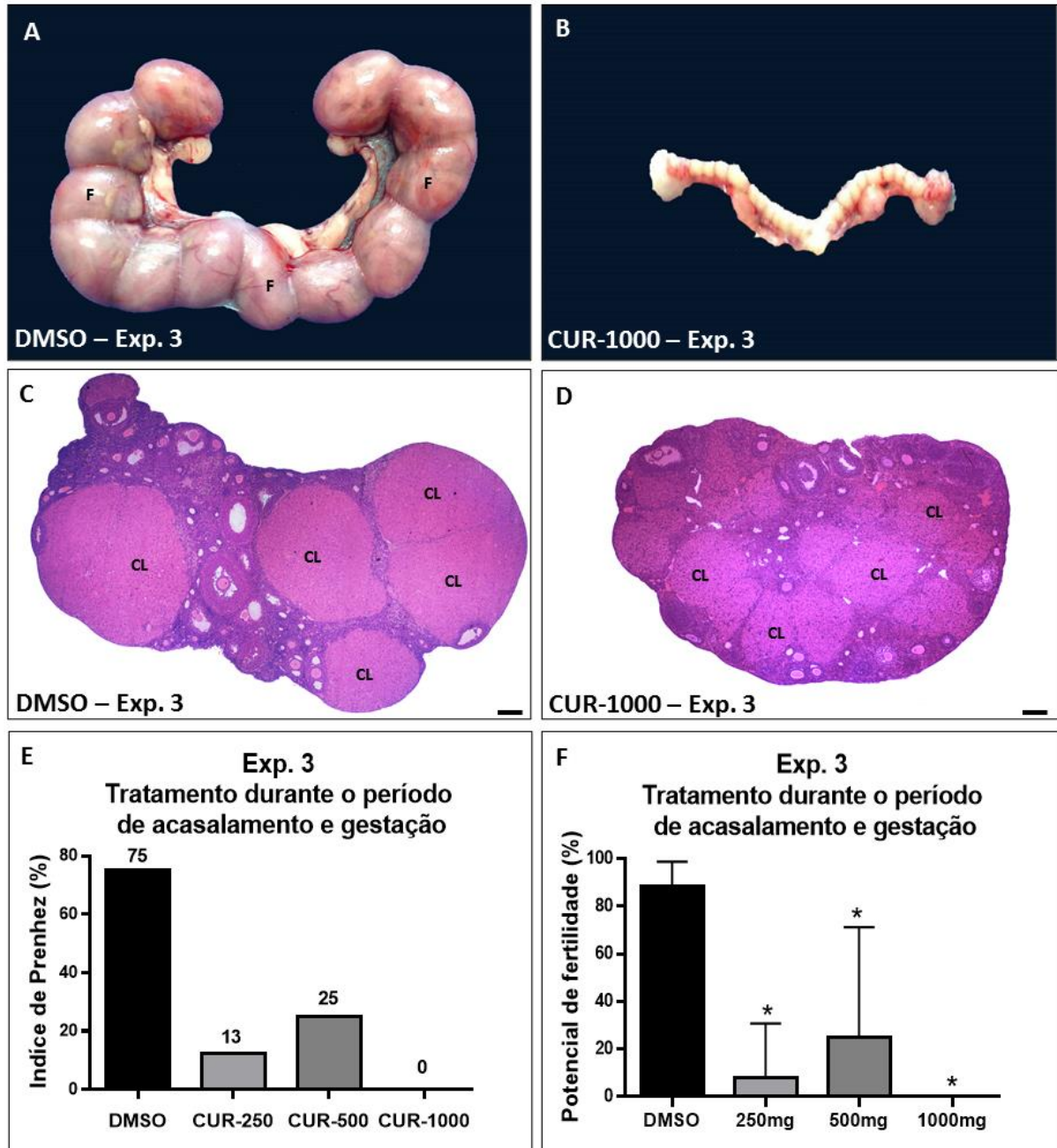
Parâmetros	Continuação			
	DMSO	CUR-250	CUR-500	CUR-1000
Número de corpos lúteos <sup>1</sup>	24,5 ± 21,0	48,4 ± 17,1	36,8 ± 22,1	40,1 ± 10,6
Número de implantações <sup>1</sup>	9,3 ± 6,3 <sup>a</sup>	1,1 ± 3,2 <sup>b</sup>	2,9 ± 5,3 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
Número de fetos viáveis <sup>1</sup>	11,2 ± 3,2 <sup>a</sup>	8,0 <sup>a</sup>	10,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
Perda pré-implantação (%) <sup>1</sup>	34,0 ± 41,9 <sup>a</sup>	92,0 ± 22,7 <sup>b</sup>	77,9 ± 41,0 <sup>b</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
Perda pós-implantação (%) <sup>1</sup>	9,7 ± 9,0	11,1 ± 0,0	8,7 ± 0,5	0,0 ± 0,0

Média±DP. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ . Letras diferentes representa diferença estatística entre os grupos.



**Figura 8.** Análise de fertilidade de camundongas adultas tratadas com DMSO (veículo) e curcumina durante 28 dias antes do acasalamento. **A.** Útero gravídico de camundonga tratada com DMSO. **B.**

Útero gravídico de camundonga tratada com curcumina. **C.** Fotomicrografia de ovário de camundonga prenha tratada com DMSO. **D.** Fotomicrografia de ovário de camundonga prenha tratada com curcumina (Coloração HE). Barra branca: 1cm. Barra preta 200 $\mu$ m **E.** Gráfico representando o índice de prenhez. **F.** Gráfico representando o potencial de fertilidade. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ .



**Figura 9.** Análise de fertilidade de camundongas adultas tratadas com DMSO (veículo) e curcumina durante o acasalamento e gestação. **A.** Útero gravídico de camundonga tratada com DMSO. **B.** Útero não-gravídico de camundonga tratada com curcumina. **C.** Fotomicrografia de ovário de camundonga prenha tratada com DMSO. **D.** Fotomicrografia de ovário de camundonga não-prenha tratada com curcumina (Coloração HE). Barra branca: 1cm. Barra preta 200 $\mu$ m **E.** Gráfico representando o índice de prenhez. **F.** Gráfico representando o potencial de fertilidade. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguida do teste *post hoc* Holm-Sidak considerando-se a significância estatística quando  $p \leq 0.05$ .

#### **4. DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o consumo de curcumina por camundongas nulíparas durante 28 dias consecutivos provocou irregularidade no ciclo estral com o prolongamento do diestro e redução do proestro. Apesar da curcumina ter interferido na duração desses dois estágios do ciclo estral, a frequência de folículos em desenvolvimento (primordiais, primários, secundários, pré-antrais e antrais) não foi alterada pela administração da curcumina.

No entanto, ao analisarmos somente as células da granulosa no ovário das fêmeas nulíparas, verificamos que, no grupo que recebeu o DMSO, os folículos secundários com 2-3 camadas apresentavam mais AgNORs do que os folículos secundários com 5 ou mais camadas. A correlação positiva entre a quantidade de AgNORs e a atividade proliferativa das células já foi comprovada em pesquisas anteriores (Derenzini, 2000; Pich *et al.*, 2000). Assim, o resultado encontrado reafirma que o crescimento folicular está correlacionado com o aumento da proliferação das células da granulosa.

No entanto, nos animais que receberam curcumina a quantidade de AgNORs presentes nas células da granulosa foi estatisticamente igual nos dois tipos de folículos secundários. Além disso, os folículos secundários com 5 ou mais camadas dos grupos tratados com curcumina também apresentaram quantidade inferior de AgNORs em relação aos folículos com 5 ou mais camadas do grupo que recebeu o DMSO. Em nosso estudo o tratamento com curcumina não afetou a frequência de folículos secundários, mas a atividade antiproliferativa desse composto sob as células da granulosa reduziu o número de folículos secundários com 5 ou mais camadas. A ação antiproliferativa da curcumina nas células da granulosa foi comprovada por Kádasi e colaboradores (2017). Segundo esses autores, curcumina inibiu a proliferação das células da granulosa no ovário de porcinas através da redução do acúmulo de PCNA (antígeno nuclear de células proliferativas), um marcador de proliferação celular, e inibição da expressão de seu mRNA.

Ao avaliarmos se o consumo de curcumina por um período de 28 dias consecutivos, anteriores ao acasalamento, prejudicaria o desempenho reprodutivo e de camundongas, percebemos que, em dosagens de 250mg e 500mg/kg de peso

corporal, esse composto não acarreta em danos ao potencial reprodutivo de camundongos fêmeas. Mas na dosagem de 1000mg/kg de peso corporal, a curcumina exerceu potencial contraceptivo. Nesse estudo também mostramos que a ação antifertilidade da curcumina é potencializada quando esta é administrada no período de acasalamento e início da gestação, pois nas três dosagens avaliadas (250mg, 500mg e 1000/kg/PC) curcumina foi capaz de comprometer de forma expressiva o desenvolvimento embrionário nos estágios anteriores a implantação.

A ação contraceptiva da curcumina em camundongos também foi evidenciada no estudo de Naz (2011), onde foi relatado que a administração da curcumina (20µl) em fêmeas, por via intravaginal ou intraperitoneal, no dia do acasalamento, interferiu de maneira negativa na fertilidade. Entretanto, nesse mesmo estudo, Naz (2011) observou que quando a administração da curcumina ocorreu por via oral, na mesma concentração utilizada nas vias intravaginal e intraperitoneal, os efeitos prejudiciais sob a fertilidade não foram observados. É sabido que a curcumina possui baixa biodisponibilidade e quando administrada por via oral grande parte é excretada pela bile (Lee et al., 2012). No entanto, os nossos resultados deixam claro que a curcumina administrada por via oral, nas dosagens de 250mg, 500mg e 1000mg/kg/PC, é capaz de alcançar os órgãos reprodutores femininos e comprometer a capacidade reprodutiva de camundongas. Embora em nosso estudo o efeito prejudicial da curcumina para a fertilidade tenha sido mais acentuado quando as fêmeas receberam esse composto no início do encontro com o macho, o pré-tratamento com a dose de 1000mg/kg de peso corporal 24 horas antes da fêmea ser colocada para acasalar, também demonstrou a ação antifertilidade desse composto, mostrando que em altas concentrações a curcumina pode permanecer nos ovários e útero em concentrações capazes de interferir no potencial reprodutivo.

Segundo Naz (2011), a atividade contraceptiva da curcumina é atribuída ao seu efeito prejudicial na motilidade, função e fertilidade dos espermatozoides em vez do efeito direto sobre os oócitos. No entanto, de acordo com Bielak-Zmijewska e colaboradores (2010), curcumina também tem ação prejudicial para os oócitos, pois a sua exposição a essas células retarda a retomada da meiose em oócitos, além de prejudicar o desenvolvimento embrionário. Esses autores afirmaram que a curcumina foi capaz de inibir tanto a divisão meiótica em oócitos como divisões mitóticas no

embrião de camundongos, por induzir anormalidades na estrutura de microtúbulos do fuso acromático em concentrações de 30 e 40  $\mu\text{M}$  e em concentrações de 50 $\mu\text{M}$  bloquear a formação do fuso meiótico e mitótico. Pavlok e colaboradores (2005) também demonstrou que curcumina em uma concentração de 20 $\mu\text{M}$  é capaz de impedir a quebra da vesícula germinativa, a retomada da meiose e a conclusão da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de bovinos.

Os efeitos prejudiciais da curcumina na maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário foi investigado por Chen e Chan (2012). Esses autores relataram que tanto oócitos expostos a curcumina (20  $\mu\text{M}$ ) durante a maturação *in vitro*, como óocitos retirados de camundongas tratadas anteriormente com curcumina (40  $\mu\text{M}$  diluído na água de beber) por 4 dias, apresentaram prejuízo na maturação e fertilização do oócito, o que levou a menor clivagem no oócito, apoptose anormal das células no estágio de blastocisto, redução no número de blastocistos, redução na taxa de implantação e redução na taxa de sobrevivência embrionária. Os mesmos autores também constataram que os efeitos prejudiciais da curcumina também atuou na implantação de blastocistos que foram transferidos para camundongas que receberam curcumina (40  $\mu\text{M}$  diluído na água de beber) 4 dias antes do procedimento. Esses animais apresentaram, além da redução da taxa de implantação, maior taxa de reabsorção. O estudo de Huang e colaboradores (2013) também demonstrou que a exposição à curcumina no estágio de implantação do blastocisto e durante o início do estágio de pós-implantação afeta de forma negativa o desenvolvimento do blastocisto de maneira dose-dependente.

De acordo com Chen e colaboradores (2010), curcumina é capaz de desencadear processos apoptóticos dependentes de mitocôndrias em células da massa celular interna (MCI) de blastocisto de camundongo através da geração de ERO, o que resulta no comprometimento da implantação e subsequente desenvolvimento embrionário. Estudos têm mostrado que redução de 30% ou mais do número de células na (MCI) está associada ao alto risco de perda fetal ou lesão no desenvolvimento, além disso, o número de células da MCI é essencial para a implantação adequada, e a redução dessa linhagem celular pode diminuir a viabilidade embrionária. (Pampfer *et al*, 1990; Kelly *et al.*, 1992; Chen E Chan, 2009). É provável que a apoptose excessiva antes ou durante o estágio de blastocisto elimine

linhagens celulares importantes, afetando o desenvolvimento embrionário e, potencialmente, levando ao aborto ou malformação embrionária (Byrne et al., 1999).

Embora a ação apoptótica da curcumina sobre as células da MCI presente no blastocisto, destacado nos trabalhos citados, e as evidências de que esse dano pode induzir perdas pós-implantação e mal formações embrionárias, em nosso estudo, a taxa de perda pós-implantação e número de fetos viáveis não diferiram do grupo controle, tanto nos grupos que receberam curcumina antes do acasalamento (Exp.2) como nos grupos que receberam curcumina durante o acasalamento e gestação (Exp.3).

Apesar de pesquisas mostrarem a toxicidade da curcumina a oócitos e aos embriões, e do que foi observado em nosso trabalho, estudos utilizando camundongos como modelos animais relataram que a curcumina administrada via oral (dose de até 8,4g/kg de peso corporal) não causou efeitos adversos na fertilidade e gestação de camundongos e também não provocou malformações nos seus descendentes (Bhavanishankar e Murthy, 1987; Ganiger *et al.*, 2007). O exposto acima evidencia que dependendo da forma, momento e período de exposição a curcumina, efeitos adversos podem ser observados, o que torna necessário mais estudos para conhecer a toxicidade reprodutiva desse composto.

## **5. CONCLUSÃO**

Diante do exposto, concluímos que a curcumina pode exercer efeitos prejudiciais no desempenho reprodutivo de camundongas saudáveis ao promover irregularidades no ciclo estral, retardamento no desenvolvimento do folículo secundário, através da redução da proliferação das células da granulosa desses folículos, além de exercer atividade contraceptiva e comprometer o desenvolvimento embrionário.

## 6. REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR K. B.; Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41(1), p.40-59, 2009.
- AKTAS, C.; KANTER, M.; KOCAK, Z. Antiapoptotic and proliferative activity of curcumin on ovarian follicles in mice exposed to whole body ionizing radiation. **Toxicology and Industrial Health**, v.28 (9), p.852-863, 2012.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4 (6) p. 807–818, 2007.
- BHAVANISHANKAR, T. N.; MURTHY, V. S. Reproductive response of rats fed turmeric (*Curcuma longa* L) and its alcoholic extract. *Journal of food science and technology*, v. 24(1), p. 45-49, 1987.
- BIELAK-ZMIJEWSKA, A.; PIWOCKA, K.; MAGALSKA, A.; SIKORA, E. P-glycoprotein expression does not change the apoptotic pathway induced by curcumin in HL-60 cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.53(2), 179–185, 2004.
- BIELAK-ZMIJEWSKA, A.; SIKORA-POLACZEK, M.; NIEZNANSKI, K.; MOSIENIAK, G.; KOLANO, A.; MALESZEWSKI, M.; STYRNA, J.; SIKORA, E. Curcumin disrupts meiotic and mitotic divisions via spindle impairment and inhibition of CDK1 activity. **Cell proliferation**, v.43(4), p.354-364, 2010.
- BRAYTON, C. F. Dimethylsulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinarian**, v.76 (1), p. 76- 90, 1986
- BYERS, S. L.; WILES, M. V.; DUNN, S. L.; TAFF, R. A. Mouse estrous cycle identification tool and images. **PLoS One**, v. 7 (4), p. 1-5, 2012. (Link Online – PC)
- BYRNE, A. T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D. R.; LEESE, H. J. Análise da apoptose no embrião bovino pré-implantacional utilizando TUNEL. *Journal of reproduction and fertility*, v. 117(1), 97, 105, 1999.
- CHEN, C. C.; CHAN, W. H. Injurious effects of curcumin on maturation of mouse oocytes, fertilization and fetal development via apoptosis. **International of journal molecular science**, v.13(4), p.4655–4672, 2012.
- CHEN, C. C.; HSIEH, M. S.; HSUJW, Y. D.; HUANG, F. J.; CHAN, W. H. Hazardous effects of curcumin on mouse embryonic development through a mitochondria-dependent apoptotic signaling pathway. **International journal of molecular sciences**, v.11(8), p.2839-2855, 2010.
- CHEN, C. C.; CHAN, W, H. Impact effects of puerarin on mouse embryonic development. *Reprod. Toxicology*. 28(4), p.530–535, 2009.

- CROCKER, J.; DAVID, A. R.; EGAN, B.; EGAN, M. J. How should we count AgNORs? Proposal for standardized approach. **Journal de Pathology**, v.158, p. 185-188, 1989.
- DERENZINI, M. The AgNOR. **Micron**, v.31(2), p. 117-120, 2000.
- FAN, X.; ZHANG, C.; LIU, D. B.; YAN, J.; LIANG, H. P. The clinical applications of curcumin: current state and the future. **Current pharmaceutical design**, v.19(11), p. 2011–2031, 2013
- GANIGER, S.; MALLESHAPPA, H. N.; KRISHNAPPA, H.; RAJASHEKHAR, L.; RAMAKRISHNA RAO, V.; SULLIVAN, F. A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.45(1), p.64-73, 2007.
- GHOSH, S.; BANERJEE, S.; SIL, P. C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. **Food and Chemical Toxicology**, v.83(1), p.111-124, 2015.
- GUPTA, K. K.; BHARNE, S. S.; RATHINASAMY, K.; NAIK, N. R.; PANDA, D. Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding. **FEBS Journal**, v.273(23), p. 5320-5332, 2006.
- GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B. B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. **Journals - American Association of Pharmaceutical Scientists**. V.15(1), p.195-218, 2013.
- HOOD, R. D. **Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach**, 3rd ed., CRC Press, p. 1168, 2012.
- HUANG, F. J.; LAN, K. C.; KANG, H. Y.; LIU, Y. C.; HSUW, Y. D.; CHAN, W. H.; HUANG, K. E. Effect of curcumin on in vitro early post-implantation stages of mouse embryo development. **European journal of obstetrics and gynecology and reproductive biology**, v.166 (1) p.47-51, 2012.
- JACKSON, S. J. T.; MURPHY, L. L.; VENEMA, R. C.; SINGLETARY, K. W.; YOUNG, A. J. Curcumin binds tubulin, induces mitotic catastrophe, and impedes normal endothelial cell proliferation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p.431-438, 2013.
- KÁDASI, A.; MARUNIKOVÁ, N.; ŠTOCHMALOVÁ, A.; BAUER, M.; GROSSMANN, R.; HARRATH, A. H.; KOLESÁROVÁ, A.; SIROTKIN, A. V. Direct effect of curcumin on porcine ovarian cell functions. **Animal Reproduction Science**, 182:77-83, 2017.
- KELLY, S. M.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F. Paternal cyclophosphamide treatment causes postimplantation loss via inner cell mass-specific cell death. **Teratology**, v.45(3), p.313-318, 1992.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p.137–138, 1965.

- LEE J. H.; OH, J. H.; LEE, Y. J. Biliary excretion of curcumin is mediated by multidrug resistance-associated protein 2. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.35(5), p.777–780, 2012.
- MAGALSKA, A.; SLIWINSKA, M.; SZCZEPANOWSKA, J.; SALVIOLI, S.; FRANCESCHI, C.; SIKORA, E. Resistance to apoptosis of HCW-2 cells can be overcome by curcumin- or vincristine-induced mitotic catastrophe. **International Journal of Cancer**, v.119(2), p.1811–1818, 2006.
- MOSHARI, S.; NEJATI, V.; NAJAFI, G.; RAZI, M. Insight into curcumin nanomicelle-induced derangements in male reproduction potential: An experimental study. **Andrology**, v.50(2), e12842, 2017.
- MOSIENIAK, G.; SLIWINSKA, M.; PIWOCKA, K.; SIKORA, E. Curcumin abolishes apoptosis resistance of calcitriol-differentiated HL-60 cells. **FEBS Letters**, v.580(19), p.4653–4660, 2006.
- MURPHY, C. J.; TANG, H.; KIRK, E. A.V; SHEN, Y.; MURDOCH, W. J. Reproductive effects of a pegylated curcumin. **Reproductive toxicology**, v.34(1), p. 120-124, 2012.
- NAZ, R. K. Can Curcumin Provide an Ideal Contraceptive? **Molecular Reproduction and Development**, v.78(2), p. 116-123, 2011.
- PAMPFER, S.; HERTOOGH, R.; VANDERHEYDEN, I; MICHIELS, B; VERCHEVAL, M. Decreased inner cell mass proportion in blastocysts from diabetic rats. *Diabetes*, v.39(4), p. 471-476, 1990.
- PAVLOK, A.; LAPATHITIS, G.; CECH, S.; KUBELKA, M.; LOPATAROVA, M.; HOLÝ, L.; KLÍMA, J.; MOTLÍK, J. HAVLÍČEK, V. Simulation of intrafollicular conditions prevents GVBD in bovine oocytes: A better alternative to affect their developmental capacity after two-step culture. **Molecular Reproduction Development**, v.71 (2), p.197-208, 2005.
- PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARI, E. Prognostic relevance os AgNORs in tumor pathology. **Micron**, v.31(2), p. 133-141, 2000.
- PIWOCKA, K.; BIELAK-ZMIJEWSKA, A.; SIKORA, E. Curcumin induces caspase-3-independent apoptosis in human multidrug-resistant cells. **Annals of the New York Academy of Science**. v.973(1), p.250-254, 2002.
- PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**, v.32(6), p.1053–1064, 2014.
- REUTER, S.; EIFES, S.; DICATO, M.; AGGARWAL, B. B.; DIEDERICH, M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v.76(11), p.1340–1351, 2008.

- SAK, M. E.; SOYDINC, H. E.; SAK, S.; EVSEN, M. S.; ALABALIK, U.; AKDEMIR, F.; GUL, T. The protective effect of curcumin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. **International Journal of Surgery**, v.11(9), p.967-970, 2013.
- SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J.; Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1822(12), p.1896-1912, 2012.
- SILVA, C. M.; SERAKIDES, R.; NASCIMENTO, E. F.; NUNES, V. A; RIBEIRO, A. F. C.; OCARINO, N. M. Quantificação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) como parâmetro para avaliar a proliferação das células da granulosa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55(1), p. 113-116, 2003.
- SLABBER, C. A.; GRIMMER, C. D.; ROBINSON, R. S. Solution Conformations of Curcumin in DMSO. **Journal of natural products** v.79(10) p.2726-2730, 2016.
- STANIĆ, Z. Curcumin, a compound from natural sources, a true scientific challenge – a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.72(1), p.1-12, 2017.
- TIWARI-PANDEY, R.; RAM SAIRAM, M. Modulation of ovarian structure and abdominal obesity in curcumin- and flutamide-treated aging FSH-R haploinsufficient mice. **Reproductive Sciences**, v.16(6), p.539-550, 2009.
- U.S. Environmental Protection Agency. **EPA/630/R-96/009: Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**, Washington, 1996.
- WALLACE, J.; POTTS, R. H.; SCAMOSI, J. C.; SURETTE, M. G.; SLOBODA, D. M. The murine female intestinal microbiota does not shift throughout the estrous cycle. **PloSne**, v.13(7), 2018.
- YAN, Z.; DAI, Y.; FU, H.; ZHENG, Y.; BAO, D.; YIN, Y.; CHEN, Q.; NIE, X.; HAO, Q.; HOU, D.; CUI, Y. Curcumin exerts a protective effect against premature ovarian failure in mice. **Journal of molecular endocrinology**, v.60(3), p.261-271, 2018.

## 6. CONCLUSÃO GERAL

Nossos resultados demonstraram que a administração de 250mg/kg de curcumina em camundongas, por um período de 28 dias, não acarretou danos ao fígado. No entanto, o consumo de curcumina nas doses de 500mg e 1000mg/kg, por esse mesmo período, aumentou a concentração sérica de marcadores bioquímicos da função hepática e desencadeou estresse oxidativo, alteração na reserva de glicogênio e na proporção de sinusóides no fígado.

Também demonstramos que, o consumo de curcumina pelo período e nas doses já citadas, interfere no ciclo estral e na proliferação de células da granulosa de folículos secundários. Além disso, nossos resultados da análise de fertilidade evidenciaram que, a depender da dose e do momento do consumo, curcumina pode atuar como contraceptivo. Sua ingestão na dose de 1000mg/kg, por 28 dias anteriores à cópula, comprometeu em 50% o desempenho reprodutivo de camundongas. Enquanto que o consumo de quaisquer das doses, durante a cópula e a gestação, reduziu de 75% a 100% o potencial de fertilidade em camundongas.