

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

EFEITO DA CURCUMINA, UM INIBIDOR DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF κ B, SOBRE
A VIABILIDADE DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y HUMANO DIFERENCIADO E
INDIFERENCIADO, QUANDO DESAFIADO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Aluno: Steven Richard Niedermeier

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Coorientador: Me. Matheus Augusto de Bittencourt Pasquali

Porto Alegre

2010

ABREVIATURAS

AR – Ácido Retinóico

ChAT – Colina Acetil Transferase

VMAT – Transportador de Monoamina Vesicular

FGF – Fator de Crescimento Fibroblástico

IGF – Fator de Crescimento Insulina-*like*

NF- κ B – Fator Nuclear- κ B

I κ B – Inibidor de κ B Proteínas

IKK – Cinases de I κ B

RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SOD – Superóxido Dismutase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

NAC – N-acetil-L-cisteína

IGEPAL – Octilfenoxipolietoxietanol

HRP – Horseradish Peroxidase

ÍNDICE

ABREVIATURAS	2
ÍNDICE	3
ANEXOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	7
SH-SY5Y Neuroblastoma	7
Fator Nuclear- κ B (NF- κ B)	8
A Curcumina	10
Espécies Reativas	12
Espécies Reativas e NF- κ B	13
MATERIAIS E MÉTODOS	15
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	21
CONCLUSÃO	27
PERSPECTIVAS	28
REFERÊNCIAS	29

FIGURA 1 –	34
(a) Viabilidade da SH-SY5Y Indiferenciada com Curcumina e H ₂ O ₂ após 3h	
(b) Viabilidade da SH-SY5Y Indiferenciada Tratada com H ₂ O ₂ e Co-tratada com Curcumina após 3h	
FIGURA 2 –	35
(a) Viabilidade da SH-SY5Y Indiferenciada com Curcumina e H ₂ O ₂ após 24h	
(b) Viabilidade da SH-SY5Y Indiferenciada Ttratada com H ₂ O ₂ e Co-tratada com Curcumina após 24h	
FIGURA 3 –	36
(a) Viabilidade da SH-SY5Y Diferenciada com Curcumina e H ₂ O ₂ após 3h	
(b) Viabilidade da SH-SY5Y Indiferenciada com Curcumina e H ₂ O ₂ após 24h	
FIGURA 4 –	37
(a) Translocação de p65 da SH-SY5Y Indiferenciada	
(b) Translocação de p65 da SH-SY5Y Diferenciada	

RESUMO

Introdução: A curcumina mostrou uma capacidade significativa de diminuir muitas das características de câncer. Além disso, o fator de transcrição nuclear NF- κ B é um importante complexo das reações inflamatórias das células e está envolvido em vários tipos de crescimento canceroso. Também, o peróxido de hidrogênio mostrou a capacidade a ativar o fator de transcrição de NF- κ B. Assim, a possibilidade de utilizar as características anti-inflamatórias da curcumina para inibir a ativação do NF- κ B existe. **Resultados:** Nós encontramos que nas concentrações mais altas da curcumina utilizadas no experimento, tanto sozinha quanto em co-tratamento com o H₂O₂, houve uma redução na viabilidade na SH-SY5Y indiferenciada. Contudo, também encontramos que a curcumina sozinha reduziu a viabilidade na SH-SY5Y diferenciada nas concentrações mais altas depois da incubação de 24h. Nós podemos deduzir que os efeitos da curcumina na SH-SY5Y são devidos à inibição citosólica da via do NF- κ B uma vez que reduz a translocação de p65. **Conclusão:** As evidências apontam para a funcionalidade relativa da curcumina a inibir a ativação de NF- κ B nas concentrações mais altas.

ABSTRACT

Introduction: Curcumin has shown a significant ability to reduce many of the characteristics of cancer. Moreover, the nuclear transcription factor NF- κ B is an important complex of inflammatory reactions in cells, and is implicated in several types of cancerous growth as well. Also, hydrogen peroxide has shown the ability to activate the transcription factor NF- κ B. Thus, the possibility of using the anti-inflammatory characteristics of curcumin to inhibit activation of NF- κ B exists. **Results:** We found that higher concentrations of curcumin, both alone and in co-treatment with H₂O₂, induced a decrease in viability in undifferentiated SH-SY5Y. However, we also found that curcumin alone reduced the viability in differentiated SH-SY5Y at the higher concentrations of curcumin after incubation for 24h. We can deduce the effects of curcumin on SH-SY5Y are due to the inhibition of the cytosolic pathway of NF- κ B, since it reduces the translocation of p65. **Conclusion:** The evidence points to the functionality of curcumin to inhibit NF- κ B in the highest concentrations.

INTRODUÇÃO

O uso da curcumina como um agente anti-câncer tem se mostrado eficaz através de experimentações diversas. As propriedades anti-tumorogênicas e pró-apoptóticas decorrentes da curcumina levaram nosso grupo de pesquisa a acreditar nos efeitos deste composto como um possível adjuvante a quimioterápicos no tratamento de neuroblastoma humano.

Neuroblastoma SH-SY5Y

O Neuroblastoma SH-SY5Y é uma sublinhagem clonada três vezes de neuroblastoma SK-N-SH. Neuroblastoma é considerado o câncer sólido mais comum, fora do crânio, em crianças e bebês. Este tipo de câncer é caracterizado pelo crescimento de um tumor neuroendócrino da crista neural do sistema nervoso simpático. A linhagem SH-SY5Y oferece uma vantagem única, porque ela é homogênea, similar ao neuroblastoma (N-tipo), e apresenta boa taxa de proliferação e de longa durabilidade em cultura sem contaminação². Esta designação “N-tipo” significa que uma célula indiferenciada e com capacidade proliferativa pode transformar-se em um componente neuronal permanente com uma função mais específica. Além disso, podemos induzir a diferenciação com tratamentos diferentes, por exemplo, com ácido retinóico (AR)³. Por essas características, a SH-SY5Y tem sido utilizada em diversas linhas de pesquisa de diferentes doenças neurodegenerativas.

A natureza das células indiferenciadas permite a observação dos efeitos de toxicidade ou resistência. Após a diferenciação de SH-SY5Y (com AR, por exemplo), as células ficam mais estáveis e, por isso, não podem representar fielmente neuroblastomas quando se estuda a neurotoxicidade e neuroproteção. As células diferenciadas se parecem com neurônios de cultura

primária que possuem um fenótipo maduro e funcional⁴. Isto significa que a população fica mais resistente e não-proliferativa, ocorrendo também um crescimento substancial de neuritos e caracterização de um neurônio normal⁵. Além disso, toda a morfologia da célula SH-SY5Y original altera-se. No entanto, ainda tem de ser visto se essas células diferenciadas funcionam exatamente como os neurônios maduros.

A diferenciação induzida por AR resulta num fenótipo neuronal colinérgico, capaz de sintetizar o neurotransmissor acetilcolina. Isso é mostrada pelas presenças da colina acetil transferase (ChAT)⁶ e transportador de monoamina vesicular (VMAT)⁷.

As neurotrofinas (fatores de crescimento neuronal) demonstraram uma capacidade de afetar a viabilidade, a diferenciação, a sinaptogênese e a função neuronal⁸. Curiosamente, a linhagem SH-SY5Y carece dos receptores sensíveis a neurotrofinas, e é mais comumente induzida a diferenciar por outros fatores de crescimento como o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento insulina-*like* (IGF)¹⁰. No entanto, a diferenciação da SH-SY5Y induzida pelo AR resulta na expressão aumentada de receptores para neurotrofinas e, posteriormente, aumenta a sensibilidade a eles⁹. A retirada de neurotrofinas do meio de cultura imediatamente induziria a apoptose, porque as células tentam reiniciar o ciclo celular⁶. Por isso, a SH-SY5Y mostrou a vitalidade, a sustentabilidade, e a capacidade de gerar duas possibilidades fenotípicas diferentes (diferenciadas e indiferenciadas), que utilizaremos durante o desenvolvimento experimental desta monografia.

Fator Nuclear- κ B (NF- κ B)

O fator nuclear- κ B (NF- κ B) tem um papel significativamente influente no desenvolvimento de vários cânceres como leucemia, mieloma, carcinoma de células escamosas,

câncer de mama, e células de cancro de rim¹¹. O NF-κB apresenta-se sob a forma de heterodímero ou de homodímero, os quais são compostos de diferentes polipeptídios das famílias de proteínas Rel e NF-κB (p50/p105, p52/p100, p65, c-Rel e Relib). Especificamente, na linhagem de SH-SY5Y, a subunidade p65 é presente no complexo de NF-κB. O NF-κB é implicado em reações de resposta a vários estímulos como citocinas, radicais livres, exposição ultravioleta, LDL oxidada e agentes patogênicos¹⁷. Essas proteínas são envolvidas em vários processos celulares, tais como inflamação, resposta imune, proliferação celular e apoptose¹⁸. Quando uma célula não recebe um sinal estimulante do ambiente, o NF-κB interage com o inibidor de proteínas κB (IκBs), formando um complexo inativo. Quando a célula é estimulada por fatores de crescimento (fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento derivado de plaquetas), citocinas (interleucina 1-beta ou fator de necrose tumoral alfa) ou outros agentes, a subunidade IκB é fosforilada por cinases de IκB (IKKs), e é modificada por um processo chamado ubiquitinação¹⁷. Posteriormente, o complexo ativo rapidamente atravessa o envelope nuclear e ativa muitas variações de proto-oncogenes que são responsáveis por proliferação (cyclin D1, C-myc), metástase (C-X-C receptor de quimiocina tipo 4 e TWIST), angiogênese (fator de crescimento vascular endotelial), invasão celular (molécula de adesão inter-celular-1, Proteína de adesão celular vascular 1, matrix metalloproteinase-2 e 9) e inflamação (interleucina 1-beta, interleucina 6, citocromo c oxidase subunidade II, e fatores de necrose tumoral)¹⁸. O NF-κB mostrou ser um complexo essencial na proliferação de células de neuroblastoma. A inibição de NF-κB estimula uma resposta apoptótica pelo colapso do gradiente eletroquímico mitocondrial²⁰. Isto denota que a expressão aumentada de NF-κB desempenharia um papel significativo na proliferação e sobrevivência destas células²¹. Por isso, a expressão de NF-κB tornou-se um fator importante de células não-proliferativas.

A ativação e o aumento da expressão deste fator de transcrição foram observados em várias formas do câncer. Por isso, os compostos com efeitos inibitórios sobre NF-κB podem também ser pensados como agentes anticâncer²². Além disso, o aumento na expressão de NF-κB aumenta a resistência de câncer a procedimentos e agentes quimioterápicos. Portanto, o uso de um inibidor desse fator de transcrição junto com a quimioterapia, teoricamente, poderia ser um método eficaz da erradicação de câncer *in vivo*²³. Parando a ativação de NF-κB, a transcrição e a tradução de proto-oncogenes não começa, o que conseqüentemente interromperia a proliferação descontrolada, característica de câncer e tumores. Atualmente, os métodos da inibição que vem sendo pesquisados são principalmente inibidores de IKK/NF-κB (como a curcumina e o BAY117082) e de proteassoma/NF-κB (como o PS-341 e o MG132) que são capazes de inibir a proliferação de leucemia, mieloma, câncer de mama e câncer de esôfago.²³

A Curcumina

A curcumina (diferuloilmetano) é um componente significativo do rizoma comumente conhecido como cúrcuma (*Curcuma longa*; da mesma família da raiz de gengibre). A maioria das pessoas está familiarizada com a curcumina, porque ela é o composto que produz o sabor único e a cor de pó de caril²⁵. A curcumina tem sido utilizada há milhares de anos na Índia Antiga e na China como um método para curar lesões²⁵. Esse nutracêutico químico mostrou significativas capacidades anti-inflamatória e antioxidante, tanto *in vivo* como *in vitro*. Recentemente, a curcumina vem sendo alvo de várias teorias que afirmam o seu potencial no combate a doenças inflamatórias, como doença de Alzheimer, artrite, e problemas cardiovasculares e desordens metabólicas. Além disso, o uso da curcumina como um tratamento anticâncer está sendo estudado. Esses estudos apresentam resultados positivos de inibição de

proteínas de alguns tipos de câncer²⁶, como a JNK²⁷ e a AP-1, essa última a primeira a ser implicada no potencial da curcumina como um inibidor²⁸. Dessa forma, foi proposto que a curcumina seja um inibidor direto de vários marcadores de câncer, como angiogênese, proliferação e metástase²⁹.

Essas características da curcumina podem ser usadas para o que está sendo chamada agora como a sétima característica de câncer: a inflamação²⁹. Dentro de uma célula pré-cancerosa, a inflamação pode seguir duas rotas. Uma das quais, a via intrínseca, é caracterizada pela transcrição de um oncogene que induz a célula a sintetizar mediadores inflamatórios (como NF- κ B)³⁰. Além disso, a curcumina reconhecidamente reprime a inflamação por reduzir as espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio (RNS e ROS, respectivamente), diminuindo a gravidade do dano oxidativo (comprovada pelos maiores níveis de glutatona)²⁹. Além de reunir os radicais livres, a curcumina mostrou-se capaz de evitar a oxidação lipídica, um conhecido resultado do estresse oxidativo³¹. Também, a característica eletrofílica da curcumina mostrou-se capaz de ativar as vias que produzem os antioxidantes, como a via Nrf2/ARE³⁰. A capacidade conhecida da curcumina de bloquear a ativação das vias, mediada pelos ésteres de forbol e, mais importante para este estudo, peróxido de hidrogênio é crucial. Foi mostrado que a curcumina inibe a ativação de NF- κ B após estimulação extracelular, porém antes da fosforilação de I κ B³². Devido a seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, que resultam de capacidades inibidoras da curcumina, os estudos sugerem o potencial uso dessa droga em estudos com neuroblastoma e outras desordens inflamatórias e neuronais.

Espécies Reativas

Na respiração aeróbica, o oxigênio que um organismo recebe é reduzido à água metabólica no fim de transporte de elétrons, na membrana interna mitocondrial. No entanto, nesta mesma região da mitocôndria que é tão essencial para a respiração celular o oxigênio também é reduzido de forma incompleta para formar o radical superóxido. Esta molécula é simplesmente uma variável reduzida da molécula de oxigênio, sendo mais reativa. O ânion superóxido possui um elétron desemparelhado, sendo classificado como um radical (também conhecido como radical “livre”). De fato, foi previsto que aproximadamente 2% dos elétrons que entram na cadeia de transporte de elétrons formam ROS em vez da água metabólica³³. Durante a resposta imune, os leucócitos começam a produzir uma substancial quantidade de superóxido quando estão encontrando e atacando os microrganismos invasores. Além disso, há contribuições ambientais de radicais livres. Essas ROS podem reagir com íons metálicos para formar o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), que causa dano a membranas celulares por um processo chamado peroxidação lipídica³⁰. As proteínas são facilmente desnaturadas devido a uma interação com uma espécie reativa, e as funções enzimáticas são frequentemente alteradas ou perdidas. Contudo, o dano mais perigoso que ocorre é indiscutivelmente sobre o componente mais importante de uma célula; o DNA dela. Há várias enzimas de reparo de DNA (como DNA glicosilase) que constantemente trabalham para reverter o dano oxidativo³³. As mutações que resultam da interação entre ROS e DNA são uma fonte primária na iniciação da maioria dos cânceres.

Não só o ambiente intracelular contém enzimas de reparo de DNA para reverter dano oxidativo, mas também há a presença de enzimas antioxidantes. Por exemplo, superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Posteriormente, a enzima de catalase catalisa a decomposição de H_2O_2 em água e

oxigênio³⁴. Embora H_2O_2 não seja um agente de oxidação relativamente forte, é capaz de oxidar grupos cisteínas em proteínas, e se as concentrações forem bastante significantes, pode induzir a proliferação, a detenção de ciclo de célula, e subsequentemente apoptose³⁵. Isso é crítico, porque H_2O_2 também é uma molécula com a capacidade substancial de causar o dano celular³⁵. Outra enzima importante para a proteção do dano oxidativo é a glutathione peroxidase. Ela funciona catalisando a conversão de H_2O_2 e glutathione reduzida para dissulfeto de glutathione e água³⁶. O corpo está constantemente lutando para impedir, reparar, e corrigir a produção excessiva e os efeitos das ROS. Esses mecanismos de defesa asseguram as condições homeostáticas.

Espécies Reativas e NF- κ B

Uma correlação foi demonstrada entre a presença de ROS e a ativação de NF- κ B. Mais especificamente, H_2O_2 foi mostrado como capaz de ativar o fator de transcrição de NF- κ B³⁷. Como anteriormente observado, o NF- κ B é normalmente encontrado inativado no citoplasma ligado à proteína inibidora, I κ B. Contudo, a adição de H_2O_2 resulta na dissociação do complexo, e subsequentemente a entrada de NF- κ B no núcleo. A adição de um ROS resulta em um aumento da regulação de N-acetil-L-cisteína (NAC), que aumenta o nível de glutathione intracelular para produzir a água do H_2O_2 . NAC é um regulador indireto da atividade de NF- κ B, porque aumento dos níveis de NAC consequentemente diminui a presença das ROS na célula e a activação do NF- κ B³⁷. Devido a esse potencial para ativar esse fator de transcrição e iniciar a transcrição de vários proto-oncogenes, entendemos que a consideração dos efeitos do H_2O_2 é fundamental em nossa experimentação³⁸.

OBJETIVO

Investigar o papel da curcumina no que se refere à viabilidade de células da linhagem SH-SY5Y, diferenciadas ou não, quando desafiadas com peróxido de hidrogênio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas de Células

A linhagem neuronal SH-SY5Y será utilizada neste estudo. As células foram obtidas da ATCC (Manassas, VA, EUA) e foram mantidas em uma mistura 1:1 de meios F12 Ham e Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor, suplementado com 2 mM de glutamina, 0,28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de gentamicina e 250 μg de anfotericina B, em uma atmosfera úmida de 5% de CO_2 , a 37 °C. Os meios de cultivos celulares foram substituídos a cada três dias e as células foram sub-cultivadas uma vez que atingiram 90% de confluência. Todos os tratamentos foram realizados quando as células estavam em 75% de confluência³⁹.

Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Para determinar se a curcumina interferiu na viabilidade de células SH-SY5Y, um ensaio com MTT foi utilizado. As células foram cultivadas na quantidade de 1×10^5 células/mL em placas de 96 poços. As células foram incubadas com 0, 5, 15, 30, 50 μM de curcumina, 0,1 mM de H_2O_2 (essa concentração tem sido demonstrada em trabalhos anteriores deste grupo como sendo um ativador eficaz da proliferação), ou em co-tratamento com as mesmas concentrações de curcumina e o H_2O_2 juntos. Os tratamentos foram removidos e 10 μL de MTT (0,5 mg/ml em PBS) foram adicionados em cada poço e as células foram incubadas a 37 °C por 1h. O sobrenadante foi removido, e 100 μL de DMSO foi adicionado a cada poço sob agitação. As absorbâncias a 590 e 630 nm foram quantificadas com um leitor de microplacas (SpectraMax Model 190)²⁴.

Diferenciação Neuronal

Após 24 h de cultivo celular, a diferenciação foi induzida através da redução do FBS para 1% em meio de cultura, acrescido de 10 μ M de AR durante os dias 4, 7 e 10. Esse tratamento foi repetido a cada três dias para restabelecer os níveis de AR no meio de cultura. Para avaliar as diferenças na morfologia das células em proliferação e nas células diferenciadas nos dias 4, 7 e 10, analisou-os sob microscopia óptica de contraste de fase (Nikon Eclipse TE 300)³⁹.

Fracionamento Celular e Ensaio para Imunoconteúdo

Seis placas de 6 poços (três de SH-SY5Y diferenciadas e três de SH-SY5Y indiferenciadas) foram preenchidas e incubadas por 3 dias. Depois de 3 dias, cada placa foi tratada com 0, 5, 15, 30, 50 μ M de curcumina e 0,1 mM de H₂O₂ em um dos seis poços. Então, essas placas foram colocadas para incubar durante 1h, 12h, e 24h. Após cada um dos respectivos tempos de incubação, os sobrenadantes foram retirados e 250 μ L de tampão hipotônico (pH 7,9) foram adicionados a cada poço e incubadas em gelo por 15 min. As células foram removidas do fundos de cada poço e foram coletados em tubos separados por tratamento. Dez microlitros de octilfenoxipolietoxietanol (IGEPAL®) (10%) foram adicionados e foi feita centrifugação por 10 min à 14.000 g. Os sobrenadantes resultantes foram descartados e os precipitados restantes foram suspensos em 60 μ L de tampão hipertônico (pH 7,9). Essas amostras foram incubadas por 30 min no gelo para liberar proteínas solúveis de núcleo. A parte insolúvel foi removida por centrifugação à 14.000 g por 10 min e o sobrenadante contendo proteínas nucleares foi armazenado a -80 °C para posterior análise de imunoconteúdo⁴⁰.

Iguais quantidades de proteína solúvel de núcleo foram colocadas em gel de SDS-poliacrilamida de acordo com Laemmli⁴¹, e as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL, Amersham Biosciences). Nós escolhemos observar a quantidade da p65 porque ela compõe o heterodímero NF- κ B na SH-SY5Y. A membrana foi bloqueada com PBS, 0,1% Tween 20 e 5% de leite desnatado em por 1h. Após, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (anti-p65, Santa Cruz, Santa Cruz, USA) na solução acima (16h à 4°C). Após a lavagem com PBS e 0,1% de Tween 20, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com horseradish peroxidase, em PBS, 0,1% Tween 20 e 5% de leite desnatado em pó por 1h à temperatura ambiente. e, finalmente, detectado por quimioluminescência (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL). Os filtros foram expostos os filmes de raio-x no escuro²⁴.

Análise estatística

Os resultados estão expressos em porcentagem \pm erro padrão do controle (100% são os valores do controle para cada experimento). As diferenças foram consideradas significativas para um $p < 0,05$.

RESULTADOS

Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

A figura 1a mostra os resultados de viabilidade da SH-SY5Y depois dos tratamentos com a curcumina e o H_2O_2 por 3h, obtidos pela leitura de absorvância do ensaio MTT. Nós encontramos que os tratamentos com 50 μM da curcumina e o H_2O_2 apresentaram reduções de 60 e 40%, respectivamente, na viabilidade da SH-SY5Y quando comparando com o controle. No entanto, os tratamentos com 30, 15 e 5 μM apresentaram reduções de 25, 20, e 25%, respectivamente, da viabilidade (100% = valor do controle).

A figura 1b mostra os resultados de viabilidade da SH-SY5Y indiferenciada após co-tratamento com a curcumina e H_2O_2 (0,1 mM) após 3h, obtidos pela leitura de absorvância do ensaio MTT. Nós observamos que os co-tratamentos com 50 e 30 μM da curcumina mostraram notáveis reduções de 45 e 35%, respectivamente, na viabilidade da SH-SY5Y comparando com o controle. No entanto, os co-tratamentos com 15 e 5 μM não apresentaram umas diferenças significativas da viabilidade (100% = valor do controle).

A figura 2a mostra os resultados de viabilidade da SH-SY5Y depois do tratamento com a curcumina e o H_2O_2 de 24h, obtidos pela leitura de absorvância do ensaio de MTT. O tratamento com H_2O_2 resultou em um aumento de 30% na viabilidade. Nós descobrimos que os tratamentos com 50 e 30 μM de curcumina mostraram reduções de 45 e 40%, respectivamente, na viabilidade da SH-SY5Y em relação ao controle. Curiosamente, os tratamentos com 15 e 5 μM de curcumina demonstraram aumentos de 45% da viabilidade (100% = valor do controle).

A figura 2b mostra os resultados de viabilidade da SH-SY5Y indiferenciada depois do co-tratamento com a curcumina e H_2O_2 (0,1 mM) por 24h, obtidos pela leitura de absorvância do

ensaio MTT. Vimos que o co-tratamento com 50 μM de curcumina mostrou uma diminuição de 55% na viabilidade de SH-SY5Y em relação ao controle. No entanto, o co-tratamento com 30 μM demonstrou uma redução de 20% da viabilidade. Os co-tratamentos com 15 e 5 μM apresentaram aumentos de 20 e 30%, respectivamente, na viabilidade, apesar de não apresentarem significância estatística (100% = valor do controle).

A figura 3a mostra os resultados de viabilidade da SH-SY5Y diferenciada depois do tratamento com a curcumina de 3h, obtidos pela leitura de absorvância do ensaio MTT. O tratamento com H_2O_2 mostrou uma diminuição de 35% na viabilidade celular. Também, encontramos que os tratamentos com 50, 30, 15, e 5 μM não induziram uma diferença significativa (<10%) na viabilidade das células (100% = valor do controle).

A figura 3b mostra os resultados de viabilidade da SH-SY5Y diferenciadas depois do tratamento com a curcumina de 24h, obtidos pela leitura de absorvância do ensaio MTT. Vimos que o tratamento com H_2O_2 resultou em uma redução de 40% na viabilidade. Nós encontramos que os tratamentos com 50 e 30 μM demonstraram umas reduções de 55 e 25%, respectivamente, na viabilidade. Contudo, os tratamentos com 15 e 5 μM não apresentaram aumentos significativos (<10%) na viabilidade (100% = valor do controle).

Imunoconteúdo Nuclear de p65

A figura 4a mostra a translocação de p65 dentro do núcleo de SH-SY5Y depois do isolamento de núcleos e a separação das proteínas por eletroforese. A ausência ou a presença de p65 indicam que um efeito inibitório ou não, respectivamente, sobre a ativação da via de NF- κB (quando comparado ao controle). Após o tratamento de 1h, com 50 e 30 μM de curcumina, uma pequena redução de 35% na presença da subunidade translocada foi observada. No entanto, as

amostras com 15 e 5 μM de curcumina e da amostra com H_2O_2 (0,1 mM) não apresentaram uma diferença na quantidade de p65 translocada. Após o tratamento por 3h, os tratamentos com 50, 30 e 15 μM apresentaram reduções de 30, 30 e 15%, respectivamente, na quantidade de p65 translocada, enquanto os outros tratamentos permaneceram como o controle. Após 24h, os tratamentos com 50 e 30 μM de curcumina e o tratamento de H_2O_2 apresentaram reduções de 90, 85 e 70%, respectivamente, na quantidade de p65 translocada. No entanto, os tratamentos com 15 e 5 μM de curcumina mostraram pequenas diminuições de 25% na subunidade translocada.

A figura 4b mostra a translocação de p65 para o núcleo de SH-SY5Y diferenciada como mostrado depois do isolamento de núcleos e a separação das proteínas por eletroforese. Após o tratamento de 1h, todas as concentrações da curcumina tiveram entre 20 e 25% da quantidade de p65 translocada que foi observada no controle. Após a incubação de 3h, as amostras com curcumina apresentaram entre 30 e 40% da quantidade de p65 translocada do que foi mostrado para o controle. Em ambos tempos de 1 e 3h, o H_2O_2 apresentou a mesma quantidade da p65 translocada do que no controle. Após o tratamento por 24h, as concentrações de curcumina apresentaram entre 15 e 30% da quantidade de p65 translocada que foi observada do controle. Além disso, observou-se uma diminuição de 25% na quantidade de translocado p65 no tratamento do H_2O_2 em relação ao controle.

DISCUSSÃO

O controle e a erradicação de neuroblastoma são essenciais para o tratamento e a supressão eventual deste câncer. Utilizamos o conhecimento de que a curcumina apresentou capacidades anti-câncer e antiinflamatória, e de que foi demonstrado que ela é capaz de inibir a fosforilação de I κ B feita pelo peróxido de hidrogênio^{25, 27, 28, 29}, para testar a eficácia dela em células de neuroblastomas. Utilizamos a linhagem de células SH-SY5Y e tentamos ver os efeitos da curcumina e H₂O₂ na viabilidade das células. Quanto a SH-SY5Y diferenciada (fenótipo semelhante ao de neurônios maduros), nós tentamos ver se os efeitos seriam menores em uma população dessas células saudáveis *in vivo*, possibilitando assim uma proposta de tratamento para o neuroblastoma com a curcumina.

O tratamento com H₂O₂ (0,1 mM) sobre ambas, SH-SY5Y diferenciada (fig. 3a) e indiferenciada (fig. 1a), resultou em cerca de 60% e 40% de redução, respectivamente, na população quando comparado com controle depois de 3h. Isto parece estar resultando dos efeitos danosos pelo H₂O₂. Como vimos previamente, H₂O₂ é uma ROS produzida na reação do superóxido com a enzima superóxido dismutase, e que quando se decompõe forma o radical hidroxila, com efeitos deletérios em células³⁷. O H₂O₂ é uma molécula que pode reagir com metais de transição (ex: Fe²⁺) e, através da reação de Fenton, gerar um radical altamente reativo: o hidroxil (•OH). O hidroxila está envolvido com danos em lipídeos, proteínas e DNA³³.

No entanto, depois das células SH-SY5Y diferenciadas (fig. 3b) e indiferenciadas (fig. 2a) terem sido incubadas por 24h com H₂O₂ (0,1 mM), os resultados foram diferentes. A viabilidade das células diferenciadas diminuiu 40% quando comparada com a viabilidade do grupo controle. Isto pode ser explicado pela incapacidade das células diferenciadas de se dividir

e proliferar, possivelmente pela inativação da via de NF- κ B (fig. 4b). Por isso, quando tratadas com H₂O₂, e analisadas após 24h, a ativação de NF- κ B mediada por ROS não ocorre e os efeitos letais de H₂O₂ são observados. Por outro lado, vimos 30% de aumento na população SH-SY5Y indiferenciada após de 24h da incubação. Já que essas células de neuroblastoma são indiferenciadas, podemos assumir que elas contêm uma forma funcional do NF- κ B. Esperávamos observar uma ativação da via de NF- κ B mediada pelo H₂O₂, mas o ensaio imunocitoquímico exibiu uma menor quantidade de translocação do NF- κ B no núcleo.

Com tratamento da curcumina em SH-SY5Y indiferenciada, esperávamos observar uma redução na viabilidade do neuroblastoma enquanto mantendo viabilidade nas células diferenciadas. Depois de 3h (fig. 1a) da incubação com curcumina em SH-SY5Y indiferenciada, observamos uma redução notável na viabilidade só com o tratamento (quase uma 40% de redução quando em comparação com o controle) e uma menor redução nos experimentos restantes (entre 25-20% comparado com o controle). Presumivelmente, o resultado do tratamento pode ser creditado para a inibição extremamente eficaz da fosforilação de I κ B pela grande quantidade de curcumina disponível, e a conseqüente inibição de NF- κ B causando a redução de viabilidade do neuroblastoma³¹.

A SH-SY5Y diferenciada não exibiu uma redução proeminente da população de células depois de 3h (fig. 3a) em todas as concentrações da curcumina (<20% quando comparado com o controle). Isto pode sugerir mais uma vez que a curcumina possivelmente não tenha um alvo nestas células para agir devido à dormência relativa associada com neurônios diferenciados^{4, 18}. Assim, nós podemos determinar que os neuroblastomas diferenciados não são tão afetados por tratamentos da curcumina depois de 3h, enquanto as células indiferenciadas demonstraram uma redução marcada na viabilidade.

O mesmo experimento foi realizado com a SH-SY5Y indiferenciada (fig. 2a) com um tempo de incubação por 24h. As células tratadas com 50 μM da curcumina sofreram uma redução de 45% na viabilidade, enquanto o tratamento com 30 μM de curcumina causou uma redução 40%. Curiosamente, as amostras tratadas com 15 e 5 μM da curcumina apresentaram um efeito de aumentar a viabilidade; na verdade, são semelhantes a amostra tratada com H_2O_2 . Nós podemos deduzir que estas concentrações de curcumina são provavelmente demasiadas baixas para inibir continuamente a ativação da via de NF- κB , conforme visto na figura 4a. Ainda, baixas concentrações da curcumina poderiam estar estimulando alguma outra rota de sobrevivência nas células indiferenciadas, o que levaria ao aumento de MTT visto na figura 2a.

Observou-se um resultado diferente no teste de 24h com diferenciadas SH-SY5Y (fig. 3b). Nas amostras tratadas com 50 e 30 μM de curcumina, observamos umas diminuições de 55 e 25% da viabilidade. Como dito anteriormente, a curcumina demonstrou a capacidade de induzir a apoptose em células²⁸. Portanto, podemos supor que as concentrações relativamente mais altas de curcumina foram capazes de induzir uma diminuição da viabilidade. As amostras com 15 e 5 μM de curcumina foram baixas demais para provocar uma mudança na viabilidade.

Também nós executamos co-tratamentos com as mesmas quatro concentrações da curcumina em conjunto com o H_2O_2 (0,1 mM) e incubamos estas duas amostras da SH-SY5Y indiferenciadas durante 3h (fig. 1b) ou 24h (fig. 2b). Nestes experimentos, podemos observar os efeitos estimulantes de H_2O_2 e os efeitos inibitórios da curcumina sobre a via do NF- κB e observar a viabilidade resultante. Devemos ter em mente que um tratamento sozinho com H_2O_2 de 0,1 mM depois de 3h resultou em uma redução na viabilidade de mais de 50% quando em comparação com o controle. Depois de 3h de incubação, nós observamos que os co-tratamentos com 50 e 30 μM da curcumina mostraram marcadas reduções de 45 e 35%, respectivamente, na

viabilidade da SH-SY5Y indiferenciada. Em adição, quando em comparação com o tratamento com só 50 e 30 μM da curcumina por 3h, podemos observar que as reduções da viabilidade nos co-tratamentos são 10% maiores. Isto pode ser devido ao dano oxidativo resultante da presença de H_2O_2 (como visto no tratamento de 3h com H_2O_2 sozinho)³³. Os resultados do co-tratamentos com 15 e 5 μM não foram significativamente diferentes do controle ou das mesmas concentrações de curcumina sozinha.

O co-tratamento por 24h (fig. 3b) com 50 μM de curcumina resultou em uma diminuição de 55% na viabilidade, que foi 10% maior do que o tratamento para 24h com curcumina sozinho. Podemos novamente atribuir a inibição da ativação da via do NF- κ B mediada pelo H_2O_2 à curcumina juntamente com o dano oxidativo resultante da presença de H_2O_2 livre. Além disso, o co-tratamento com 30 μM curcumina (resultou em uma redução de 20% da viabilidade) não induziu a mesma redução na viabilidade como o tratamento com 30 μM curcumina sozinha que resultou em uma redução de 40% de viabilidade. Poderíamos supor que esta modificação na viabilidade pode ser devido à ação inibitória insuficiente de 30 μM da curcumina quando desafiada com H_2O_2 , que demonstrou a capacidade de aumentar a viabilidade após 24h. Curiosamente, os co-tratamentos com 15 e 5 μM de curcumina resultou em aumentos de 10 e 25% na viabilidade, respectivamente. Esses aumentos foram 35 e 20% menores, respectivamente, do que os tratamentos de 15 e 5 μM de curcumina sozinha. Podemos atribuir esse resultado à capacidade de curcumina a inibir a fosforilação de I κ B e os efeitos deletérios dos ROS.

Nós podemos sugerir que uma inibição da via do NF- κ B ocorreu, devido à observação da diminuição de translocação do fator de transcrição através da membrana nuclear por Western Blot da SH-SY5Y indiferenciada (fig. 4a). Depois de 1h do tratamento com 50 e 30 μM de

curcumina, uma pequena redução de 35% na subunidade translocada foi observada. No entanto, as amostras com 15 e 5 μM de curcumina e a amostra com H_2O_2 não apresentaram diferenças nas quantidades de p65 translocada. Depois de 3h de incubação com os tratamentos, pudemos observar reduções de 5% maiores nas quantidades do NF- κB translocado nos tratamentos com 50 e 30 μM da curcumina quando em comparação com a incubação de 1h. O tratamento 15 μM de curcumina resultou em uma pequena redução de 15% no NF- κB translocado, mas o tratamento 15 μM de curcumina e tratamento de H_2O_2 não apresentaram diminuições observáveis. Após 24h, os tratamentos com 50 e 30 μM de curcumina e o tratamento de H_2O_2 apresentaram reduções de 90, 85 e 70%, respectivamente, na quantidade de p65 translocada. No entanto, os tratamentos com 15 e 5 μM de curcumina mostraram pequenas diminuições de 25% na subunidade translocada. O resultado do tratamento com o H_2O_2 foi inesperado, porque o teste de MTT mostrou um aumento da viabilidade enquanto que o ensaio de imunocitoquímica mostrou uma redução do NF- κB translocado. Talvez outros fatores de transcrição sejam responsáveis por esse grande aumento da viabilidade. Testes adicionais desses ensaios são necessários para determinar a presença verdadeira do NF- κB .

Os resultados observados de Western Blot da SH-SY5Y diferenciada (fig. 4b) foram diferentes dos resultados das células indiferenciadas. Após o tratamento de 1h, todas as concentrações de curcumina tiveram entre 20 e 25% da quantidade de p65 translocada que foi observada de controle. Após a incubação de 3h, as amostras com curcumina apresentaram entre 30 e 40% da quantidade de p65 translocada do que foi mostrado de controle. Isto nos leva a acreditar que a quase ausência desta subunidade provavelmente não foi devido à inibição de NF- κB pela curcumina. Essa quase ausência de formação é provavelmente devido à característica não-proliferativa observada nos neuroblastomas diferenciados, o que se assemelha ao

neurônios^{4,5}. Provavelmente durante a diferenciação ocorreu um silenciamento do NF- κ B e portanto a curcumina não tem um alvo em que agir. Em ambos tempos de 1 e 3h, o H₂O₂ apresentou a mesma quantidade da p65 translocada de controle. Após o tratamento por 24h, as concentrações de curcumina apresentaram entre 15 e 30% da quantidade de p65 translocada que foi observada do controle. Além disso, observou-se uma diminuição de 25% na quantidade de p65 translocado no tratamento do H₂O₂ em relação ao controle. A exposição a H₂O₂, um conhecido ativador do NF- κ B, pode ter danificado as células³⁴, o que causa uma mutação que ativa a via do NF- κ B. A ativação do NF- κ B no controle é provavelmente devido à falta da curcumina e a capacidade dela a inibir esta ativação. Portanto, ao longo do tempo as células diferenciadas começaram a mais uma vez ativar essa via, talvez retornando a essa expressão numa tentativa de modular a expressão de genes de defesa contra estresse oxidativo e morte.

CONCLUSÃO

Nós observamos que as duas maiores concentrações de curcumina induziram as diminuições significativas nas viabilidades da SH-SY5Y indiferenciada após 3h; no entanto, as duas concentrações mais baixas foram capazes de reduzir um pouco a viabilidade em 3h enquanto que em 24h foram observados aumento das viabilidades. Além disso, observamos que a curcumina sozinha diminuiu a viabilidade da SH-SY5Y diferenciada nas duas maiores concentrações estudadas, após 24h de incubação. Quando as duas maiores concentrações de curcumina foram desafiadas por H₂O₂ em co-tratamento, reduções na viabilidade maiores do que as vistas quando a curcumina sozinha foi adicionada foram observadas. Além disso, menores aumentos nas viabilidades foram observados quando as duas menores concentrações foram desafiadas por H₂O₂ do que quando essas mesmas concentrações não foram desafiadas. Nós podemos deduzir que os efeitos da curcumina na SH-SY5Y indiferenciada são devidos à inibição citosólica da via do NF-κB, uma vez que reduz a translocação de p65. No entanto, apesar de ser uma ferramenta interessante no tratamento de gliomas e leucemias, a curcumina apresentou efeito sobre a SH-SY5Y, o que indica que mais experimentos utilizando culturas primárias de neurônios ao invés de linhagens são necessários para esclarecer seu efeito e possíveis riscos de uso como tratamento.

PERSPECTIVAS

- Repetir os experimentos neste trabalho para confirmar os resultados iniciais.
- Realizar experimentos de co-tratamento H_2O_2 e curcumina por 24 h em células SH-SY5Y diferenciadas.
- Realizar experimentos com H_2O_2 e curcumina em culturas primárias de neurônios.
- Realizar experimentos de shift-assay para investigar não só a translocação como a efetiva funcionalidade de NF- κ B em SH-SY5Y.

REFERÊNCIAS

1. JL Biedler, L Helson, and BA Spengler. Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 1973; 33: 2643-2652.
2. S Joshi, R Guleria, J Pan, and D DiPette, US Singh. Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene* 2006; 25: 240-247.
3. J Singh and G Kaur. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Res* 2007; 1154: 8-21.
4. A Gimenez-Cassina, F Lim, and J Diaz-Nido. Differentiation of a Human Neuroblastoma Into Neuron-Like Cells Increases Their Susceptibility to Transduction by Herpesviral Vector. *Journal of Neuroscience Research* 2006; 84: 755-767.
5. S Fagerström, S Pählman, C Gestblom, and E Nånberg. Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 775-785.
6. A Adem, ME Mattsson, A Nordberg, and S Pählman. Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. *Brain Res* 1987; 430: 235-242.
7. SP Presgraves, T Ahmed, S Borwege, and JN Joyce. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res* 2004; 5: 579-598.

8. HR Xie, LC Hu, and GY Li. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's Disease. *Chin Med* 2010; 123(8): 1086-1092.
9. E Lavenius, V Parrow, E Nånberg, and S Pålman. Basic FGF and IGF-I promote differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells in culture. *Growth Factors* 1994; 10: 29-39.
10. G Cernaianu, P Brandmaier, G Scholz, OP Ackermann, R Alt, and K Rothe, et al. All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 1284-1294.
11. S Reuter, S Prasad, K Phromnoi, J Ravindran, B Sung, VR Yadav, R Kannappan MM Chaturvedi, and BB Aggarwal. Thiocolchicoside Exhibits Anticancer Effects through Downregulation of NF-kB Pathway and Its Regulated Gene Products Linked to Inflammation and Cancer. *Cancer Prev Res* 2010; 3(11): 1462-72.
12. M Barkett ,and TD Gilmore. Control of apoptosis by Rel/NFkB transcription factors, *Oncogene* 1999; 18: 6910–24.
13. B Rayet and C Gélinas. Aberrant rel/NFκB genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999; 18(49): 6938-47.
14. C Nakanishi and M Toi. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(4): 297-309.
15. V Baud and M Karin. Is NF-kB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat. Rev. Drug Disc* 2009; 8: 33-40.
16. BB Aggarwal. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004; 6(3): 203-8.

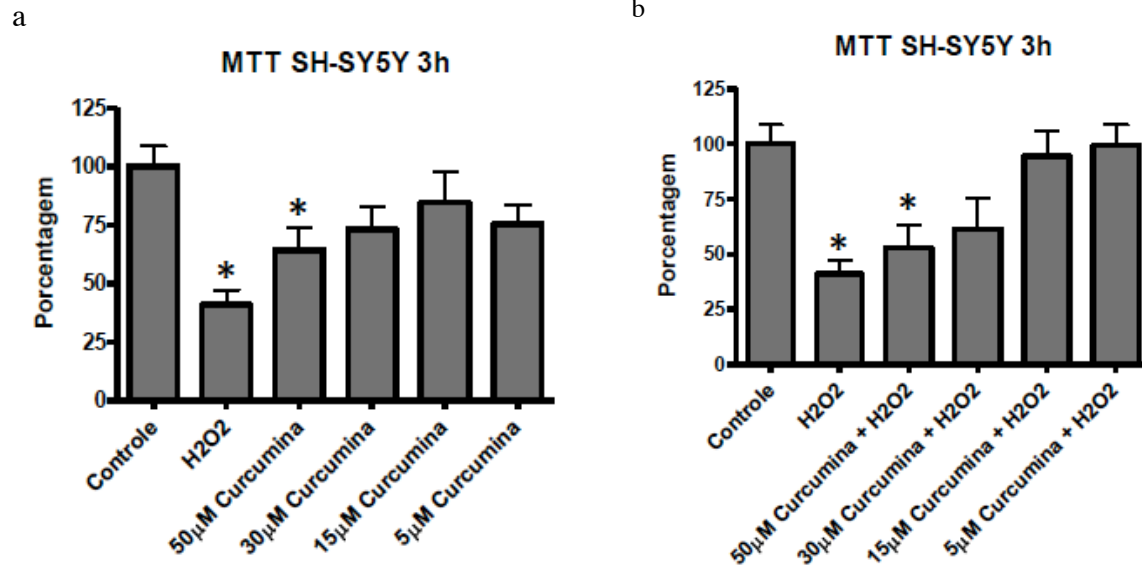
17. TD Gilmore. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; 25(51): 6680–4.
18. AR Brasier. The NF- κ B regulatory network. *Cardiovasc. Toxicol* 2006; 6(2): 111–30.
19. TX Xie, Z Xia, N Zhang, W Gong, and S Huang. Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncol Rep* 2010; 23(3): 725-32.
20. X Bian, AW Opipari Jr., AB Ratanaproeaksa, AE Boitano, PC Lucas, and VP Castle. Constitutively active NFkappa B is required for the survival of S-type neuroblastoma. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 42144-50.
21. AA Beg and D Baltimore. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996; 274: 782-84.
22. C Nakanishi and M Toi. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(4): 297-309.
23. A Zanutto-Filho, A Delgado-Cañedo, R Schröder, M Becker, F Klamt, and JC Fonseca Moreira. The pharmacological NFkappaB inhibitors BAY117082 and MG132 induce cell arrest and apoptosis in leukemia cells through ROS-mitochondria pathway activation. *Cancer Letters* 2010; 288: 192-203.
24. A Zanutto-Filho, E Braganhol, R Schröder, LH Souza, RJ Dalmolin, MA Pasquali, DP Gelain, AM Battastini, and JC Moreira. NFkB inhibitors induce cell death in glioblastomas. *Biochem Pharmacol* 2010; [Epub ahead of print].
25. C Freudlsperger, J Greten, and U Schumacher. Curcumin Induces Apoptosis in Human Neuroblastoma Cells *via* Inhibition of NFkB. *Anticancer Research* 2008; 28; 3-8.

26. E Sikora, G Scapagnini, and M Barbagallo. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immunity & Ageing* 2010; 7(1): 1-4.
27. YR Chen and TH Tan. Inhibition of the c-Jun-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 1998; 17: 173-178.
28. AJ Whitmarsh, P Shore, AD Sharrocks, and RJ Davis. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 1995; 269: 403-407.
29. S Aggarwal, H Ichikawa, Y Takada, SK Sandur, S Shishodia, and BB Aggarwal: Curcumin (diferuloylmethane) downregulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 195-206.
30. V Calabrese, TE Bates, C Mancuso, C Cornelius, B Ventimiglia, MT Cambria, L Di Renzo, A De Lorenzo, and AT Dinkova-Kostova: Curcumin and the cellular stress response in free radical-related diseases. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:1062-1073.
31. G Jayaprakasha, L Jaganmohanrao, and K Sakariah. Chemistry and Biological Activities of *C. Longa*. *Trends in Food Science & Technology* 2005; 16.12: 533-48.
32. S Singh and B Aggarwal. Activation of Transcription Factor NF- κ B Is Suppressed by Curcumin (Diferuloylmethane). *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 24995-25000.
33. B Halliwell and JMC Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon, 1989. Print.
34. SK Holley Dhar and DK St Clair. Manganese superoxide dismutase versus p53: the mitochondrial center. *Acad Sci* 2010; 1201: 72-78.

35. W Gehrman, M Elsner, and S Lenzen. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic beta cells. *Diabetes Obes Metab* 2010; 2: 149-158.
36. J Bouayed and T Bohn. Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state: Health Beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3(4): 228-237.
37. R Schreck, P Rieber . and PA Baeuerle. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10: 2247-2258.
38. JT Hancock, R Deslkan, and SJ Neill. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biomedical Society* 2001; 29(2): 345-50.
39. FM Lopes, R Schröder, ML da Frota, Jr., A Zanotto-Filho, CB Müller, AS Pires, RT Meurer, GD Colpo, DP Gelain, F Kapczinski, LC Moreira, C Fernandes Mda, and F Klamt. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Research* 2010; 37: 85-94.
40. A Zanotto-Filho, DP Gelain, R Schröder, LF Souza, MAB Pasquali, F Klamt, and JCF Moreira. The NFκB-mediated Control of RS and JNK Signaling in Vitamin A-treated Cells: Duration of JNK–AP-1 Pathway Activation May Determine Cell Death or Proliferation. *Biochemical Pharmacology* 2009; 77.7: 1291-301.
41. UK Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.

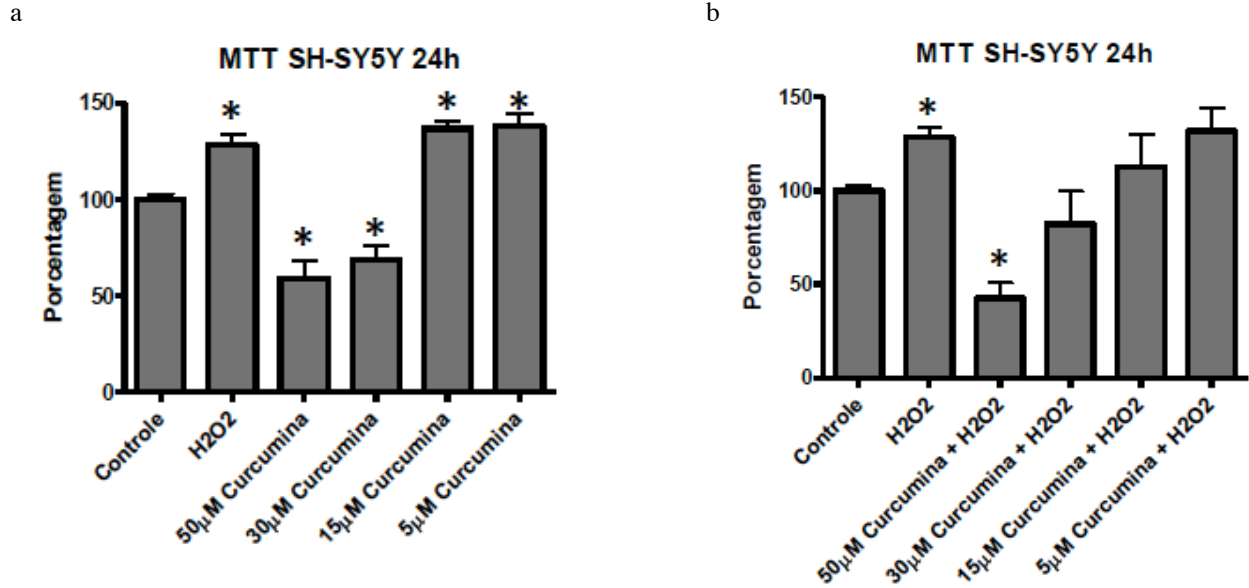
ANEXOS

Figura 1 (MTT)



(a) Os efeitos *in vitro* da curcumina (5 – 50 μM) e do H_2O_2 (0,1 mM) sobre a viabilidade de SH-SY5Y indiferenciada após 3h (n = 6). (b) Os efeitos *in vitro* do co-tratamento com curcumina (5 – 50 μM) e o H_2O_2 (0,1 mM) sobre a viabilidade de SH-SY5Y indiferenciada após 3h (n = 6). Os valores indicaram média \pm DP dos experimentos como a porcentagem do controle respectivo. *Considerado estatisticamente diferente do valor de controle quando $p < 0.05$ (Uma-via ANOVA seguido pelo teste de Duncan).

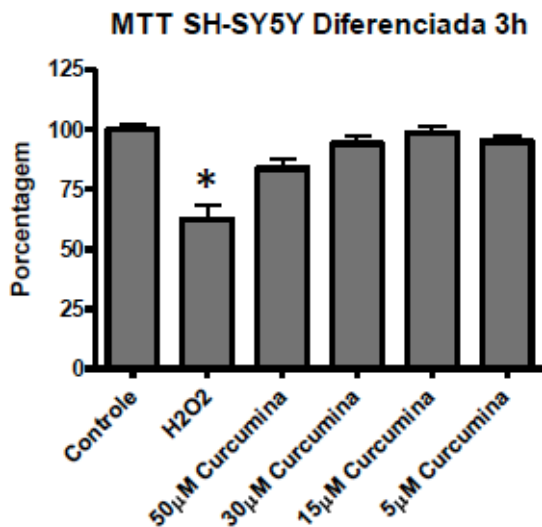
Figura 2 (MTT)



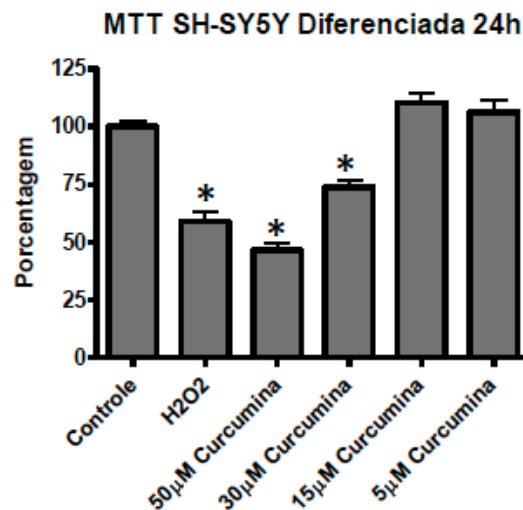
(a) Os efeitos *in vitro* da curcumina (5 – 50 μM) e do H_2O_2 (0,1 mM) sobre a viabilidade de SH-SY5Y indiferenciada após 24h (n = 6). (b) Os efeitos *in vitro* do co-tratamento com curcumina (5 – 50 μM) e o H_2O_2 (0,1 mM) sobre a viabilidade de SH-SY5Y indiferenciada após 24h (n = 6). Os valores indicaram média \pm DP dos experimentos como a porcentagem do controle respectivo. *Considerado estatisticamente diferente do valor de controle quando $p < 0.05$ (Uma via ANOVA seguido pelo teste de Duncan).

Figura 3 (MTT)

a

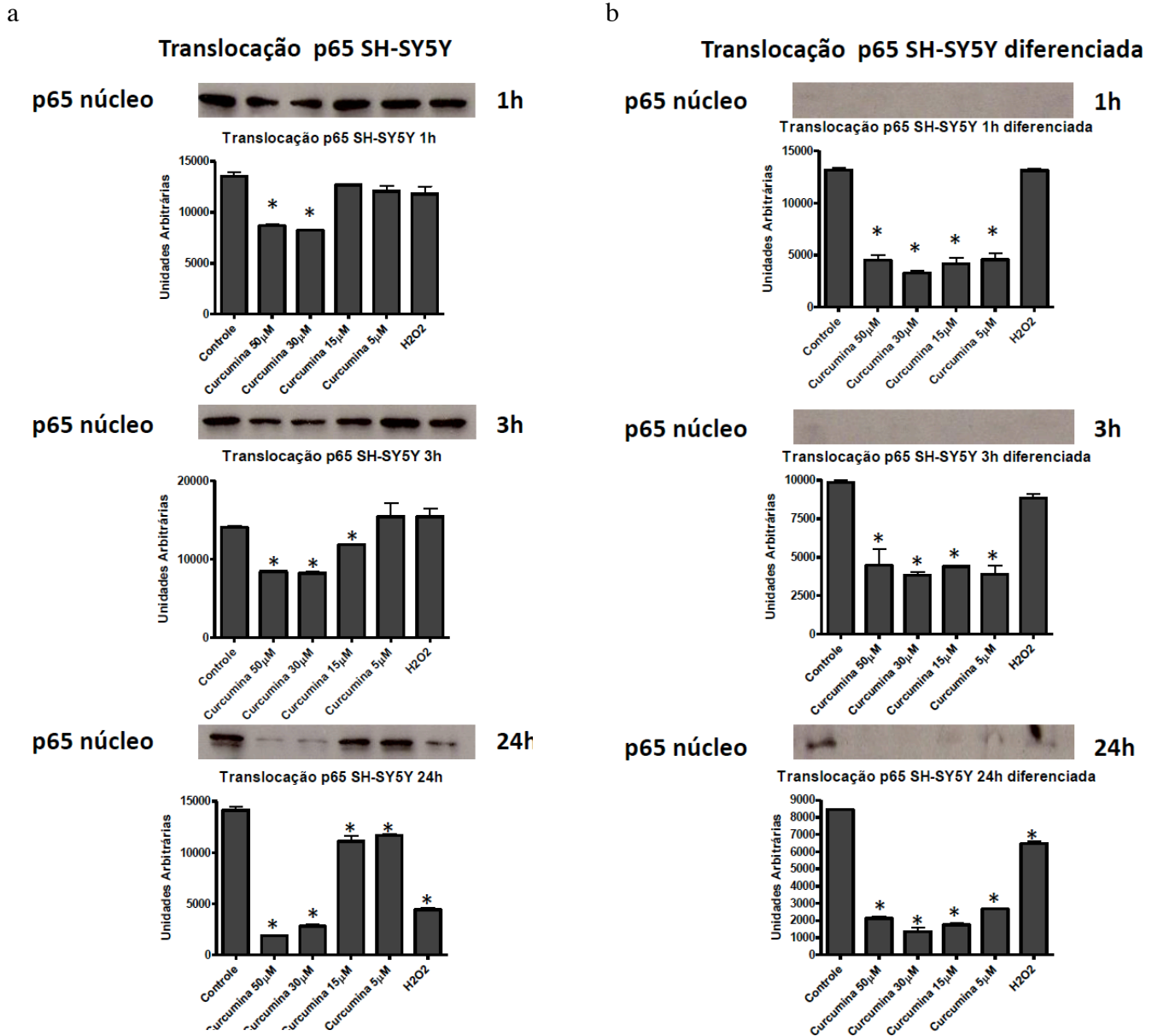


b



(a) Os efeitos *in vitro* da curcumina (5 – 50 µM) e do H₂O₂ (0,1 mM) sobre a viabilidade de SH-SY5Y diferenciada após 3h (n = 6). (b) Os efeitos *in vitro* da curcumina (5 – 50 µM) e do H₂O₂ (0,1 mM) sobre a viabilidade de SH-SY5Y diferenciada após 24h. (n = 6) Os valores indicaram média ± DP dos experimentos como a porcentagem do controle respectivo. *Considerado estatisticamente diferente do valor de controle quando p < 0.05 (Uma-via ANOVA seguido pelo teste de Duncan).

Figura 4 (Western Blot)



(a) A quantidade da proteína nuclear NF- κ B (subunidade p65) nos núcleos de SH-SY5Y indiferenciada tratada com a curcumina (5 – 50 μ M) e H₂O₂ (0,1 mM) para 1, 3, e 24h (n = 1).

(b) A quantidade da proteína nuclear NF- κ B (a p65 subunidade) nos núcleos de SH-SY5Y diferenciada tratada com a curcumina (5 – 50 μ M) e H₂O₂ (0,1 mM) para 1, 3, e 24h (n = 1).