

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

Marina Pedra Seady

**EFEITO DA CURCUMINA, COMPOSTO PRESENTE NO CURRY, EM
CÉLULAS ASTROGLIAIS**

Porto Alegre

2016

Marina Pedra Seady

**EFEITO DA CURCUMINA, COMPOSTO PRESENTE NO CURRY, EM
CÉLULAS ASTROGLIAIS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora:

Prof^a Dra. Marina Concli Leite

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Seady, Marina Pedra
Efeito da curcumina, composto presente no curry,
em células astrogliais / Marina Pedra Seady. -- 2016.
38 f.

Orientadora: Marina Concli Leite.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS,
2016.

1. Curcumina. 2. Astrócito. 3. Neuroproteção. I.
Leite, Marina Concli, orient. II. Título.

Marina Pedra Seady

**EFEITO DA CURCUMINA, COMPOSTO PRESENTE NO CURRY, EM CÉLULAS
ASTROGLIAIS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprovou o trabalho de conclusão de curso em 13 de dezembro de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dra. Martine Elizabeth Kienzle Hagen - UFRGS

Dra. Fernanda Hansen - UFRGS

Prof^a Dra. Marina Concli Leite (Orientadora – UFRGS)

Dedico este trabalho ao meu avô, João Pedra, que
sempre procurou a cura através do alimento.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me proporcionarem a possibilidade de graduar na federal, e por encontrarem potencial até nos meus erros. Pelo amor incondicional e pela paciência, a minha gratidão infinita.

Ao meu irmão, pelo bom humor, paciência, e por nunca me decepcionar.

Ao Rafael, pelo abraço quando eu estava cansada, pelo silêncio quando eu estava insuportável e pela maneira tranquila de ver a vida. Minhas conquistas também são tuas.

As minhas avós, Marinês e Zenaide, por acharem que o meu trabalho é o mais legal do mundo.

À toda minha grande família Pedra Seady, por acreditar nos meus sonhos, comprar brigas por mim e não me esquecer nos tempos em que não fui presente.

As minhas amigas e irmãs Ana Carolina, Ana Cláudia e Carol por tudo que já fizeram e tem feito por mim e às colegas de graduação pelo carinho e apoio imprescindíveis para minha formação como profissional e pessoa.

À minha orientadora Marina, pela didática, paciência e companheirismo com que conduziu esse trabalho. Também por ter me apresentado ao mundo da bioquímica, e por estar sempre disposta (seja o horário que for).

À Fafá, por encontrar um espaço no fim do doutorado pra lisar placas comigo. Pela disponibilidade e pela leveza com que lidou com minhas angústias, sempre preparada com uma palavra de apoio.

Ao lab 31, pela compreensão, amizade e pelos momentos de descontração. Que possamos conviver juntos mais muitos anos!

“Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que,
quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho.”

(Thomas Jefferson)

RESUMO

Com o aumento da expectativa de vida no mundo, também aumenta a preocupação com a saúde dos idosos e as doenças neurológicas que acometem principalmente essa população. A nutrição tem se inserido na prevenção de doenças, principalmente com compostos naturais. Nesse sentido, a curcumina tem se destacado como um importante composto bioativo. A *Curcuma longa* L., da família Zingiberaceae é uma planta originária da Índia, onde a prevalência de Alzheimer é aproximadamente um quarto da prevalência nos Estados Unidos. A curcumina é um agente antioxidante, anti-inflamatório e antiproliferativo, que vem demonstrando ser capaz de realizar resposta antioxidante e diminuir citocinas pró-inflamatórias principalmente através da redução da translocação de NFκB ao núcleo. Para estudar o efeito desse composto no sistema nervoso central, devemos destacar o papel dos astrócitos na neuroproteção. Astrócitos são células que atuam na manutenção da homeostase iônica, metabolismo energético e modulação da sinalização sináptica, já estabelecidos como células sentinelas essenciais e moduladoras dinâmicas da função neuronal. O astrócito também atua na detoxificação da amônia e do glutamato, reciclando o mesmo para o neurônio, por meio da enzima glutamina sintetase. Ainda, atua na resposta antioxidante cerebral, através da síntese de GSH. Visto que os astrócitos têm papel fundamental na neuroproteção e que pouco se sabe sobre o efeito da curcumina nesse tipo celular, o objetivo do trabalho foi investigar, por meio de parâmetros astrogliais, a atividade protetora da curcumina em aspectos inflamatórios e oxidativos. Os parâmetros avaliados foram o conteúdo intracelular de GSH, a atividade da enzima glutamina sintetase, a translocação de NFκB ao núcleo induzida por IL-1β e a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio. Para isso, utilizamos células astrogliais C6 expostas à curcumina de 5 a 20 μM. O conteúdo intracelular de GSH foi aumentado nas concentrações mais altas de curcumina, sugerindo efeito protetor antioxidante, que poderia estar associado à reversão de dano celular. A concentração de 15 μM foi efetiva para diminuir a morte celular observada quando induzida por peróxido de hidrogênio. Quanto aos parâmetros inflamatórios, a curcumina foi capaz de reverter parcialmente a translocação de NFκB induzida por IL- 1β. Nossos dados mostram que a curcumina é um potencial agente antioxidante e anti-inflamatório em células astrogliais. Ainda são necessários mais estudos para investigar as rotas pelas quais esse composto age e as concentrações efetivas para um efeito neuroprotetor.

Palavras chave: Curcumina, Astrócito, Neuroproteção.

ABSTRACT

Life expectancy is increasing in the world and this is accompanied by a growing concern about the health of the elderly and the neurological diseases that mainly affect this population. Nutrition has been inserted in the prevention of diseases, mainly with regard to natural compounds. In this sense, curcumin has been highlighted as an important bioactive compound. *Curcuma longa* L., of the family Zingiberaceae is a plant native from India, where an Alzheimer's prevalence is approximately one-fourth of the prevalence in the United States. Curcumin is an antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative agent that has been shown to be capable of performing an antioxidant response and decreasing proinflammatory cytokines through the reduction of NF κ B translocation to the nucleus. In order to study the effect of this compound in the central nervous system, we must highlight the role of astrocytes in neuroprotection. Astrocytes are cells that act on ion homeostasis maintenance, energy metabolism and modulation of synaptic signaling, already established as essential sentinel cells and dynamic modulators of neuronal function. Astrocytes can also act on the detoxification of ammonia and glutamate, recycling it to neurons, through the enzyme GS. Furthermore, astrocytes act on the brain's antioxidant response through the synthesis of GSH. Since astrocytes play a key role in neuroprotection and little is known about the effect of curcumin on this cell type, the aim of this study was to investigate, through astroglial parameters, a protective activity of curcumin in relation to inflammatory and oxidative damage. We measured GSH intracellular content, GS enzyme activity, IL-1 β -induced NF κ B translocation to the nucleus, and hydrogen peroxide induced cell death. To evaluate these we used C6 astroglial cells exposed to curcumin in concentrations ranging from 5 to 20 μ M. The intracellular content of GSH was increased at the highest concentrations of curcumin, suggesting antioxidant protective effect, which could be associated with reversal of cell damage. The concentration of 15 μ M was effective to decrease cell death observed when induced by hydrogen peroxide. Besides, curcumin was able to partially reverse IL-1 β -induced NF κ B translocation. Our data show that curcumin is a potential antioxidant and anti-inflammatory agent in astroglial cells. Further studies are still needed to investigate the routes that curcumin participates and the effective concentrations for a neuroprotective effect.

Key Words: Curcumin, Astrocyte, Neuroprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina Trifosfato

COX-2 - Ciclooxigenase 2

DMEM – do inglês “Dulbecco's Modified Eagle's Medium”

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GABA - Ácido Gama-Aminobutírico

GFAP - Proteína Glial Fibrilar Ácida

GCL - Glutamato Cisteína Ligase

GS - Glutamina Sintetase

GSH – Glutathiona Reduzida

GSS – Glutathiona Reduzida Sintetase

IL-1 β - Interleucina-1Beta

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível

MTT – do inglês “Methylthiazolyldiphenyl–tetrazolium Bromide”

NF κ B - Fator Nuclear Kappa B

SFB - Soro Fetal Bovino

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido Dismutase

TNF - Fator de Necrose Tumoral

VN - Vermelho Neutro

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1. Introdução.....	13
1.1. Curcumina.....	13
1.2. Doenças neurodegenerativas e inflamação	14
1.3. Astrócitos	15
1.4. Sinapse tripartite e marcadores de astrócitos	15
1.5. Utilização de células C6 como um modelo de astrócitos <i>in vitro</i>	18
2. Objetivos	18
2.1. Objetivos gerais	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Metodologia	19
3.1. Materiais	19
3.2. Linhagem de células C6.....	19
3.3. Desenho experimental.....	19
3.4. Ensaio de redução de MTT	19
3.5. Incorporação de VN.....	19
3.6. Atividade da GS.....	20
3.7. Conteúdo de GSH	20
3.8. Incorporação de Iodeto de Propídeo	20
3.9. Imunocitoquímica para NFkB.....	21
3.10. Dosagem de proteínas	21
3.11. Análise Estatística.....	21
4. Resultados	22
4.1. A curcumina não alterou a viabilidade e a integridade celular	22
4.2. A atividade da enzima GS não foi aumentada pela curcumina.....	24
4.3. A curcumina aumenta a concentração intracelular de GSH.....	25
4.4. Ação da curcumina na proteção celular	25
4.4.1. Proteção contra a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio.....	25
4.4.2. Translocação de NFkB	26
5. Discussão.....	27

6. Conclusão	32
7. Referências Bibliográficas	33

1. Introdução

1.1. Curcumina

Com o aumento da expectativa de vida no mundo, também aumenta a preocupação com a saúde dos idosos. No Brasil, a expectativa de vida em 2016 é de 75,7 anos e, em 2060, estima-se que seja de 80,2 anos, segundo o IBGE. Dentre os temas alvo de preocupação de saúde pública para essa faixa etária, destacam-se as doenças que levam à demência, visto que o declínio na qualidade de vida do indivíduo causa impacto na família e na sociedade. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2011, o número de pessoas a nível mundial que viviam com demência era de 35,6 milhões, e estudos epidemiológicos indicam que este número deve crescer a um ritmo alarmante.

A nutrição tem se inserido na prevenção de doenças, com destaque para estilos de alimentação e compostos fitoterápicos encontrados em diversas regiões do mundo. Alguns estudos demonstram que padrões dietéticos como o Mediterrâneo associado ao consumo de frutas e vegetais podem diminuir o risco de desenvolver demência no decorrer do envelhecimento. Além do estilo Mediterrâneo, compostos específicos tem ganhado espaço, como flavonoides e catequinas. Dentre as catequinas, a epigallocatequina galato, a qual possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, incluindo a capacidade de modular a expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (SCAPAGNINI *et al.*, 2011). Outro componente investigado com propriedades anti-inflamatórias e anti-envelhecimento é o resveratrol, protetor natural contra o estresse ambiental em plantas, presente na alimentação principalmente através das uvas (MORALES *et al.*, 2014). Buscando alternativas para a prevenção das doenças neurológicas, destaca-se o interesse em compostos ativos de plantas medicinais utilizadas no dia-a-dia da população brasileira. A utilização de temperos naturais como terapêuticos sustenta-se pelo fato de não ser invasiva, ter preço acessível e empoderar o paciente a buscar sua própria saúde através da alimentação. Dentre estes veículos de terapia na alimentação, destaca-se a curcumina.

A *Curcuma longa* L., da família Zingiberaceae, conhecida como açafrão-da-terra, cúrcuma, turmérico, açafrão-da-índia, açafroa ou gengibre amarelo, é uma planta originária da Índia e cultivada em todo o mundo tropical para uso medicinal e condimentar. É uma planta herbácea, anual, aromática, com ramificações laterais comprimidas. Da sua raiz seca e moída se extrai o pó, utilizado na culinária como condimento ou corante de cor amarela e brilhante, e no preparo de medicamentos. Em sua composição química, o principal constituinte é a curcumina. Por ser originária da Índia, a população indiana tem consumo alto da planta, e a

prevalência de Alzheimer neste país é aproximadamente um quarto da prevalência nos Estados Unidos (PEREIRA;MOREIRA, 2009).

A curcumina é um agente antioxidante, antiinflamatório e antiproliferativo (AGGARWAL *et al.*, 2013). Já foi mostrado que uma dose de 150 mg é eficaz em diminuir níveis séricos de citocinas próinflamatórias como interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), sendo que algumas delas podem atuar por intermédio da translocação de fator nuclear kappa B (NFkB) (USHARANI *et al.*, 2008). A curcumina também mostrou diminuir a translocação do NFkB ativada por iNOS e COX-2 (FRAUTSCHY *et al.*, 2001).

Em estudos com animais, a curcumina demonstrou ser metabolizada rapidamente, resultando em uma baixa biodisponibilidade após administração oral. Um estudo testou sua biodisponibilidade em 12 humanos sadios oferecendo doses de curcumina através de capsulas contendo 187 mg. Antes disso, foi oferecido um desjejum contendo 42% de gordura a fim de aumentar sua absorção, já que a mesma é lipofílica. O tempo necessário para a curcumina atingir a concentração máxima no plasma foi entre 1-4 h. A respeito de sua metabolização, sabe-se que uma dose da mesma sofre processos de glicuronidação e sulfatação no intestino, além de redução hepática a tetrahydrocurcumina. Entretanto, a atividade da tetrahydrocurcumina parece ser menor e menos eficaz em diminuir parâmetros inflamatórios em comparação as mesmas doses de curcumina livre. Também é sabido que as formas conjugadas predominam no plasma com relação à forma livre após uma única administração, porém, talvez uma administração repetida possa levar a um acúmulo de curcumina no intestino, logo, no plasma. A curcumina tem uma rápida metabolização e é eliminada da circulação sanguínea em 24 h (VAREED *et al.*, 2008).

1.2. Doenças neurodegenerativas e inflamação

As doenças neurodegenerativas tem em comum um processo fisiológico atuante na resposta imune que tem como objetivo proteger o corpo humano contra infecções e traumas: a inflamação. Dentre esses mediadores podem ser citadas citocinas, proteínas inflamatórias, tromboxanos, prostaglandinas, fatores de coagulação, leucotrienos, inibidores de protease, espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido nítrico, proteína C reativa, dentre outros (ALAM *et al.*, 2016). Essa reação não significa que toda inflamação seja danosa, visto que o propósito desse processo visa eliminar, limitar o crescimento ou remover patógenos que ameaçam a saúde dos tecidos. Porém, em circunstâncias particulares, esse processo pode ser exacerbado,

sendo ativado de forma crônica e perpetuando além do tempo necessário, produzindo assim mais dano do que solucionando.

No sistema nervoso central (SNC), a resposta inflamatória é ativada em resposta ao dano neurológico, seja ele agudo ou crônico, na forma de liberação de mediadores inflamatórios (ALAM *et al.*, 2016). Dentre eles podemos citar a interleucina 1 β (IL-1 β), que pertence à família de citocinas pleitróficas, o que confere a ela possibilidade de exercer sua função no SNC, sendo possível detectar sua expressão em níveis baixos no cérebro adulto saudável (HE *et al.*, 2015). Porém, em resposta ao dano local ou disfunção cerebral é superexpressa pela microglia, célula com função equivalente ao macrófago no SNC. Desta forma, se encontra elevada em doenças neurodegenerativas clássicas, supondo que a mesma possa sustentar processos patológicos (HE *et al.*, 2015; ALAM *et al.*, 2016). Em uma visão geral, a resposta inflamatória no SNC é mediada principalmente pela microglia e pelos astrócitos (BROWN; BAL-PRICE, 2003; PARPURA *et al.*, 2012). Os astrócitos, particularmente, atuam na regulação da acessibilidade de fatores que modulam a neurogênese, tanto reagindo à liberação de citocinas ou também liberando as mesmas. Essa função é importante, visto que confere ao astrócito possibilidade de realizar manutenção de contatos sinápticos a longo prazo após uma lesão (PARPURA *et al.*, 2012).

1.3. Astrócitos

Astrócitos são células do SNC que atuam na homeostase iônica, no metabolismo energético e na sinalização sináptica. Anatomicamente, são células distribuídas pelo sistema nervoso, que não apresentam axônios e dendritos. São altamente fibrosos, unicamente caracterizados por uma densa rede de processos interpostos entre elementos neuronais, sendo que alguns deles fazem contato e envolvem paredes vasculares (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). As responsáveis por interconectar os processos astrocíticos derivados da mesma célula são as junções gap, que por sua vez são permeáveis à glicose, e, dentre outras funções, podem facilitar a difusão de substratos energéticos dos vasos nutritivos aos neurônios metabolicamente ativos incorporados dentro da matriz astrocítica. Dentre suas funções, os astrócitos promovem a maturação neuronal, formação de sinapse e regulação da angiogênese (WANG; BORDEY, 2008; RANSOM; RANSOM, 2012).

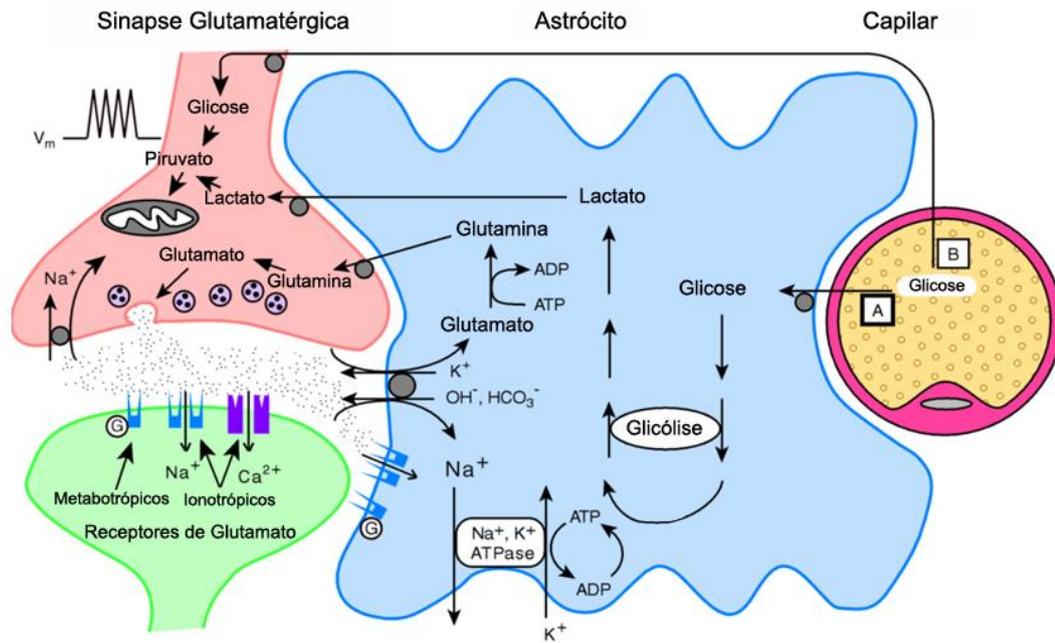
1.4. Sinapse tripartite e marcadores de astrócitos

Apesar de suas diversas funções, por muito tempo os astrócitos foram definidos como “células de suporte” para outras células como os neurônios. Funcionalmente, astrócitos ainda

são definidos como células que não geram potencial de ação, mas limpam o espaço extracelular e fornecem substratos necessários para a função neuronal. Com o avanço nos estudos, hoje são bem estabelecidos como células sentinelas essenciais e moduladoras dinâmicas da função neuronal, considerando a forte cooperação metabólica entre esses dois tipos celulares. Além disso, evidências recentes demonstram que os mesmos podem contribuir ativamente na plasticidade e atividade sináptica através da regulação da liberação de neurotransmissores e na alteração do fluxo sanguíneo (WANG; BORDEY, 2008; RANSOM; RANSOM, 2012). A comunicação entre astrócitos e neurônios confere um caráter bidirecional, no qual além do fluxo de informações entre o neurônio pré e pós-sináptico, existe ainda uma troca de informação com elementos sinápticos, respondendo à atividade e regulando a transmissão sináptica. Essa modalidade de comunicação é chamada de sinapse tripartite, onde o astrócito figura como parte integrante da sinapse (PEREA *et al.*, 2009).

No caso da transmissão sináptica glutamatérgica, o neurônio pré-sináptico libera glutamato, que é então captado em sua maioria por transportadores de aminoácidos excitatórios astrocíticos (EAATs), processo possibilitado pela alta afinidade desses transportadores expressos na membrana plasmática (PARPURA *et al.*, 2012). No astrócito, o glutamato é convertido em glutamina para que a mesma seja liberada e recaptada pelos neurônios, a fim de ser novamente convertida em glutamato (Figura 1) (MAGISTRETTI E; PELLERIN, 1999; BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009). A glutamina sintetase (GS) é a responsável pela síntese de glutamina por meio de glutamato e amônia, dando continuidade ao ciclo glutamato-glutamina. Esse processo previne excitotoxicidade do glutamato na fenda sináptica, além de detoxificar a amônia no SNC (CHAN *et al.*, 2016). A enzima GS é expressa majoritariamente em astrócitos, no SNC, o que a torna uma proteína marcadora desse tipo celular.

Figura 1



Adaptado de Magistretti e Pellerin, 1999.

Os astrócitos também participam de outros processos envolvendo elementos sinápticos, portanto, expressam transportadores para uma variedade de neurotransmissores e neuromoduladores incluindo glutamato (já citado acima), GABA, glicina e histamina. Essa expressão facilita a remoção dos neurotransmissores citados da fenda sináptica, finalizando a transmissão e mantendo a excitabilidade neuronal (BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009).

Além da GS, os astrócitos podem ser identificados por outros marcadores específicos, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), proteína de filamentos intermediários do citoesqueleto, que desempenha importante função na arquitetura celular, no processo de astrogliose reativa e na formação de cicatriz glial (WANG; BORDEY, 2008; SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Outro marcador que pode ser citado é a S100B, uma proteína ligante de cálcio que pertence à família de proteínas S100 e está envolvida na regulação do citoesqueleto e ciclo celular. A S100B tem sido proposta como um marcador da ativação astrogliar, visto que alterações em sua quantidade no SNC têm sido associadas com diversas doenças neurológicas (SOFRONIEW; VINTERS, 2010; GUERRA *et al.*, 2011).

No que diz respeito à atuação do astrócito na proteção antioxidante no SNC, o tripeptídeo glutatona (GSH), formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato, é a molécula mais importante. A GSH age reduzindo moléculas oxidativas como peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, e é sintetizada pelo astrócito de forma mais expressiva do que as demais células do cérebro. Os astrócitos liberam GSH no espaço extracelular, onde a mesma é clivada pela enzima astrocítica γ -glutamil transpeptidase, resultando em glicina, cisteína e o

dipeptídeo cisteína-glicina, que servem como precursores para a síntese neuronal de GSH (GEGG *et al.*, 2003; BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009).

Estímulos patogênicos como a Doença de Alzheimer e Encefalopatia Hepática podem prejudicar a função astrocitária, tanto na sua ação sináptica, na resposta ao dano agudo ou crônico e na proteção antioxidante, além de comprometer a funcionalidade e viabilidade neuronal (BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009).

1.5. Utilização de células C6 como um modelo de astrócitos *in vitro*

A linhagem de células de glioma C6 foi clonada a partir de um tumor da glia de ratos induzido por N-nitrosometilureia. É considerada como uma linhagem neural, e, em especial, apresenta características similares ao astrócito, como a expressão das proteínas GFAP e S100B (BENDA *et al.*, 1968). Essas características se apresentam em passagens mais altas, considerando que uma passagem representa a ação da tripsina, protease com função de descolar a camada de células para que a mesma então seja cultivada novamente (PARKER *et al.*, 1980). Apesar de apresentar limitações, esta linhagem celular é amplamente usada como modelo de astrócitos, estudando-se propriedades e mecanismos deste tipo celular em diversas condições (MANGOURA *et al.*, 1989).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar, por meio de parâmetros astrogliais, uma possível atividade protetora da curcumina em aspectos inflamatórios e oxidativos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade da curcumina por meio de ensaios de viabilidade e integridade celular, utilizando curva de concentração da mesma;
- Avaliar a resposta de células astrogliais à curcumina quanto ao conteúdo intracelular de GSH e atividade da GS;
- Avaliar a capacidade anti-inflamatória da curcumina em um modelo de translocação de NFκB ao núcleo induzida por IL-1β;
- Investigar um efeito protetor da curcumina contra a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio.

3. Metodologia

3.1. Materiais

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) foi adquirida da Gibco BRL. IL-1 β , curcumina, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), vermelho neutro (VN) e materiais para cultura de células foram adquiridos da Sigma; soro fetal bovino (SFB) da Cultilab (São Paulo, Brasil). Todos os outros químicos foram adquiridos por fornecedores comerciais locais. A linhagem de células C6 foi obtida do American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA).

3.2. Linhagem de células C6

Células C6 com alto número de passagens (pelo menos 100) foram cultivadas em garrafas a uma densidade de 10^4 em DMEM (pH 7,4) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2,5 mg/mL de anfotericina B e 50,4 mg/L gentamicina em 5% CO₂/95% a 37°C. Após as células atingirem confluência, foram plaqueadas a uma densidade de 15.000 células por poço, em placas de 24 poços para serem tratadas 48 h depois.

3.3. Desenho experimental

O desenho experimental descrito abaixo foi utilizado para os experimentos de MTT, VN, GS e GSH. O desenho experimental para as demais técnicas realizadas está descrito em cada metodologia.

O meio de cultivo foi substituído por DMEM sem SFB, na presença ou não de curcumina nas concentrações de 0,5; 10; 15 ou 20 μ M, diluída em DMSO 0,1%, que foi utilizado como veículo. Após 24 h de exposição à curcumina, as células foram processadas conforme descrito em cada metodologia.

3.4. Ensaio de redução de MTT

Trinta minutos antes do término do tratamento com curcumina, as células foram incubadas com MTT 0,05 mg/mL em atmosfera de 5% CO₂/95% a 37°C. Em seguida, o meio de cultura foi removido e os cristais intracelulares formados foram dissolvidos em DMSO. Os valores de absorvância foram medidos em dois comprimentos de onda, 560 e 650 nm e o cálculo foi realizado subtraindo o valor de absorvância lido em 650 nm do valor obtido em 560 nm.

3.5. Incorporação de VN

Trinta minutos antes do término do tratamento, as células foram incubadas com VN 0,05 mg/mL em atmosfera de 5% CO₂/95% a 37°C. Em seguida, foram lavadas duas vezes com tampão fosfato por 5 minutos em cada lavagem. Após, o VN internalizado pelas células foi extraído com solução de extração contendo ácido acético, etanol e água. Os valores de absorbância foram medidos a 560 nm.

3.6. Atividade da GS

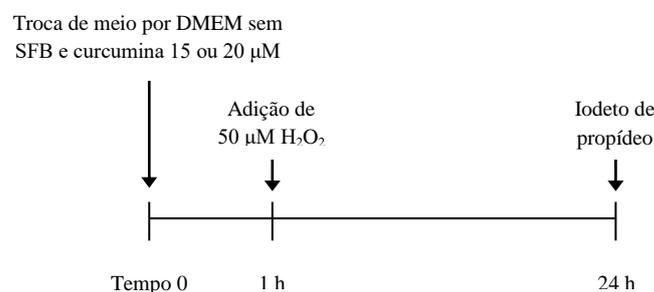
As células foram lisadas em imidazol 50 mM e incubadas a 37°C em tampão A, contendo os substratos da enzima e seus cofatores (imidazol 50 mM, hidroxilamina 50 mM, L-glutamina 100 mM, arsenato de sódio 25 mM, ADP 0,2 mM e cloreto de manganês 2 mM). Aos 15 minutos de incubação, a reação foi parada com tampão B (cloreto férrico 0,37 M, ácido tricloroacético 0,2 M e ácido clorídrico 0,67 M). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a fim de separar o excesso de proteína e o sobrenadante foi lido a 530 nm em espectrofotômetro. Para a curva da GS, foram pesadas quantidades padrão de γ -glutamil-hidroxamato em concentrações variando de 0,156 mM a 10 mM e adicionados a tampão A e tampão B para comparação com as amostras ao calcular.

3.7. Conteúdo de GSH

As células foram lisadas em tampão fosfato KCl (20 mM/140 mM) e, após, foi adicionado ácido metafosfórico (concentração final de 4,6 mg/mL) e a mistura foi centrifugada. As amostras e os pontos da curva foram pipetados em placa de 96 poços, contendo tampão GSH (fosfato de sódio monobásico monohidratado 0,1 M e EDTA 0,005 M). Após, a placa foi incubada com o-phtaldehyde a 1 mg/mL, diluído em metanol por 15 minutos a temperatura ambiente. A fluorescência foi medida utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 nm e 420 nm, respectivamente. A curva da GSH variou entre 0,9 μ M e 500 μ M.

3.8. Incorporação de Iodeto de Propídeo

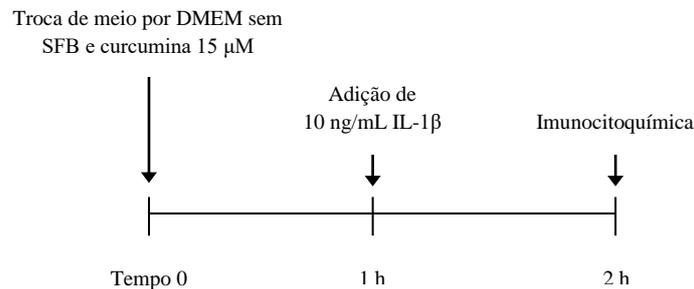
O desenho experimental para o ensaio de morte celular induzida por peróxido de hidrogênio foi realizado segundo esquema abaixo:



Quinze minutos antes do término do tempo de incubação, foi adicionado iodeto de propídeo 0,007 mM ao meio. As células foram visualizadas em microscópio invertido Nikon com TE-FM acessório de fluorescência e fotografadas. A escolha dos campos mostrados foi por representatividade, uma vez que os tratamentos foram feitos em triplicata.

3.9. Imunocitoquímica para NFkB

O desenho experimental para o ensaio de inflamação induzida por IL-1 β para medida de translocação de NFkB foi realizado segundo esquema abaixo:



Após o tempo de exposição à curcumina, as células foram fixadas por 20 min com 4% de paraformaldeído e permeabilizadas por 20 min em PBS contendo 0,2% de Triton X-100. As células fixadas foram bloqueadas por 1 h com PBS contendo 0,5% de albumina bovina e incubadas durante a noite com anticorpo policlonal anti-p65 produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnologies, 1:250) a temperatura ambiente, seguido de incubação com um anticorpo secundário anti-IgG de coelho (GE, 1:500) por 2 h a temperatura ambiente. Após lavar, os núcleos foram corados com 0,2 mg/mL de DAPI e visualizadas em microscopia de fluorescência.

3.10. Dosagem de proteínas

O conteúdo de proteínas foi medido utilizando o método de Lowry, modificado por Peterson utilizando albumina bovina como padrão (LOWRY *et al.*, 1951; PETERSON, 1977).

3.11. Análise Estatística

Dados paramétricos foram demonstrados como média \pm erro padrão e foram analisados por Teste t de Student quando dois grupos foram considerados, ou por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Duncan quando havia um maior número de grupos amostrais. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas em SPSS.

4. Resultados

4.1. A curcumina não alterou a viabilidade e a integridade celular

Para medir a viabilidade celular, usamos as técnicas de MTT e VN. A técnica de MTT tem como objetivo avaliar a viabilidade celular através de uma medida de capacidade redutora da célula. O MTT é captado pelas células e reduzido, evento evidenciado através da formação de cristais de cor violeta. Já a técnica de incorporação de vermelho neutro avalia viabilidade celular através da capacidade de endocitose. O corante é captado pelas células e se acumula em lisossomos, o que é evidenciado através da cor rosa. Uma redução nesses parâmetros, quando comparado aos valores basais, indicaria uma redução da viabilidade celular. Nas concentrações de 5, 10, 15 ou 20 μM , durante 24 h de exposição, a curcumina não foi capaz de diminuir a viabilidade celular de forma significativa comparado ao controle e ao veículo (DMSO 0.1%) nas técnicas de MTT e VN (Figura 2).

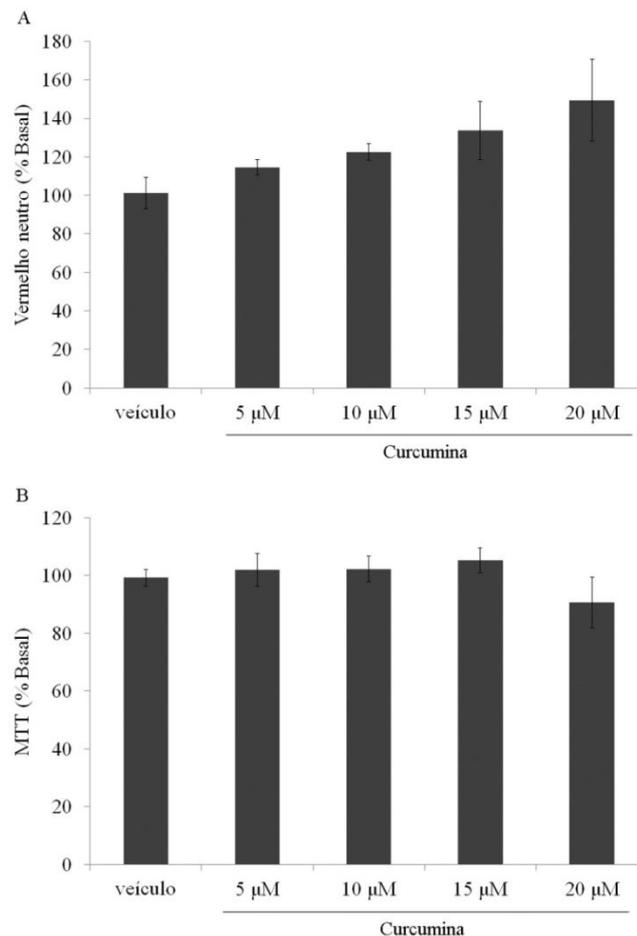


Figura 2. Efeito da curcumina sobre a viabilidade celular. Células astrogliais C6 foram tratadas com diferentes concentrações de curcumina, variando de 5 a 20 μM por 24 h em DMEM sem SFB. Ao final do tratamento, a viabilidade celular foi analisada através da incorporação do VN (A) ou da redução de MTT (B). Os dados estão mostrados como porcentagem do basal e representam a média de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via.

Quanto à integridade celular, o parâmetro utilizado foi o iodeto de propídeo, técnica cujo objetivo é detectar células com integridade de membrana prejudicada. Através de sua entrada pelas membranas plasmáticas que estejam permeáveis, o iodeto se liga ao DNA das células e marca os núcleos das células cujas membranas estão danificadas. Os núcleos são visíveis em microscópio através da cor vermelha (Figura 3).

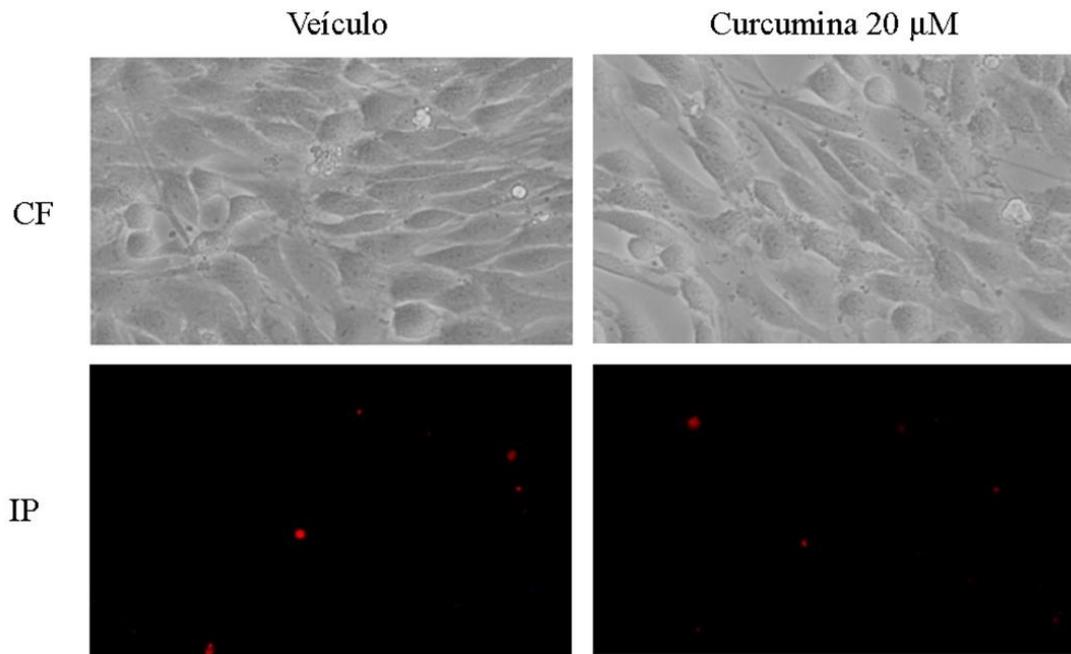


Figura 3. Efeito da curcumina sobre a integridade celular. Células astrogliais C6 foram tratadas com curcumina na concentração de 20 μ M por 24 h em DMEM sem SFB. Ao final do tratamento, a integridade celular foi analisada através da incorporação de iodeto de propídeo. A imagem mostra um campo representativo de fotos em contraste de fase (CF) e de fluorescência para o ensaio de iodeto de propídeo (IP). As células foram observadas com 2300X de aumento.

4.2. A atividade da enzima GS não foi alterada pela curcumina

A partir de uma técnica cinética colorimétrica, não detectamos variação na atividade da enzima nas concentrações de 5, 10, 15 ou 20 μM , após 24 h de tratamento (Figura 4).

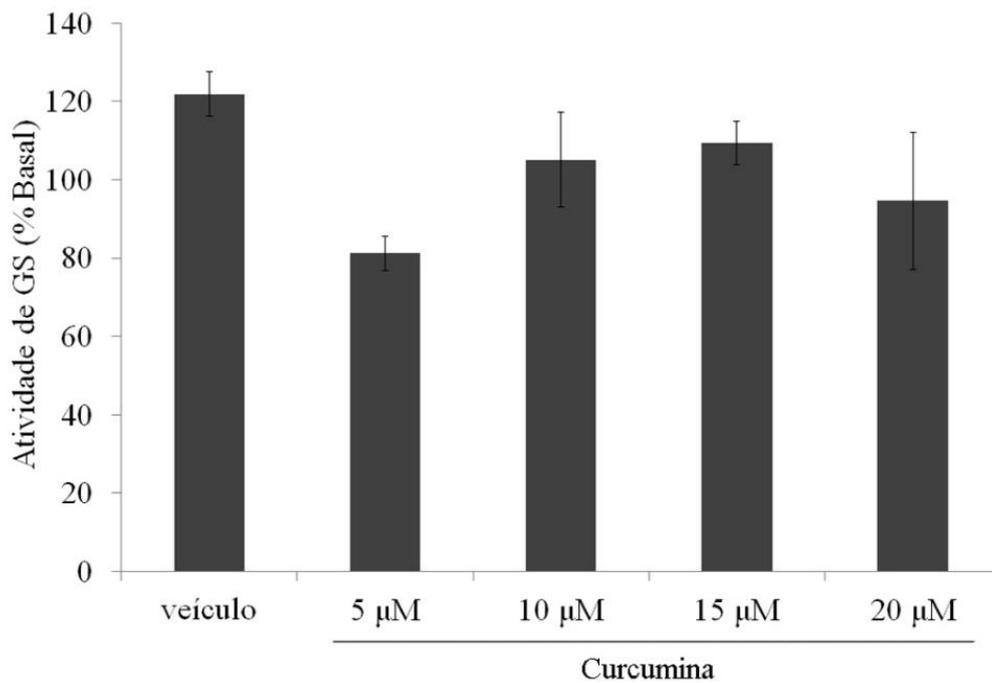


Figura 4. Efeito da curcumina sobre a atividade da enzima GS. Células astrogliais C6 foram tratadas com diferentes concentrações de curcumina, variando de 5 a 20 μM por 24 h em DMEM sem SFB. Ao final do tratamento, a atividade da GS foi medida. Os dados estão mostrados como porcentagem do basal e representam a média de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via.

4.3. A curcumina aumenta a concentração intracelular de GSH

Através da técnica de GSH, onde o OPT se liga especificamente ao tripeptídeo e fluoresce, foi constatado um aumento na concentração intracelular de glutatona reduzida nas concentrações de 15 e 20 μM após 24 h de tratamento (Figura 5).

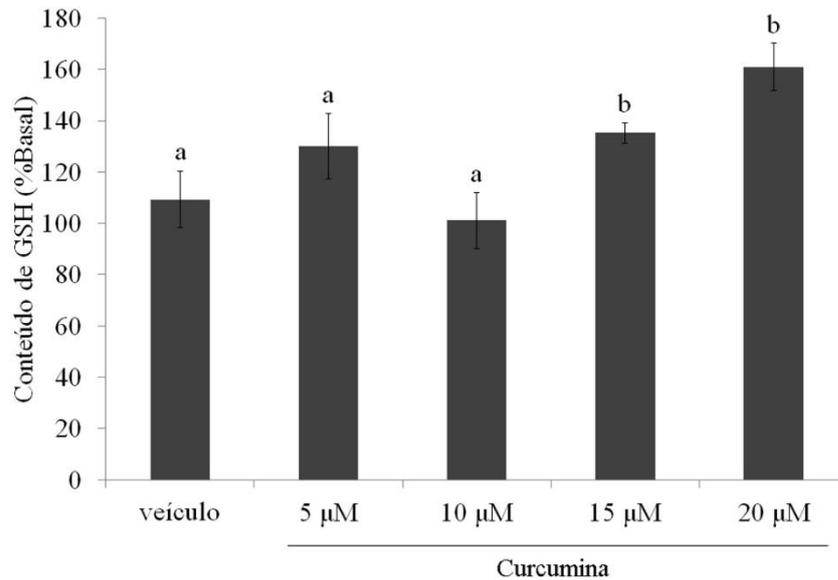


Figura 5. Efeito da curcumina sobre o conteúdo de GSH. Células astrogliais C6 foram tratadas com diferentes concentrações de curcumina, variando de 5 a 20 μM por 24 h em DMEM sem SFB. Ao final do tratamento, o conteúdo de GSH foi medido. Os dados estão mostrados como porcentagem do basal e representam a média de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan e considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferença estatística.

4.4. Ação da curcumina na proteção celular

4.4.1. Proteção contra a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio

Para investigar a proteção da curcumina contra agentes que induzem a morte celular, realizamos um pré-tratamento durante 1 h com curcumina nas concentrações de 15 e μM . Após esse período, foi adicionado o estímulo de morte, H_2O_2 na concentração de 50 μM , o qual permaneceu por mais 24 h. Após esse período, foi realizada a técnica de iodeto de propídeo, que tem como objetivo detectar células danificadas por meio de sua entrada pelas membranas plasmáticas que estejam permeáveis. Como resultado, os núcleos prejudicados são visíveis em microscópio através da cor vermelha (Figura 6).

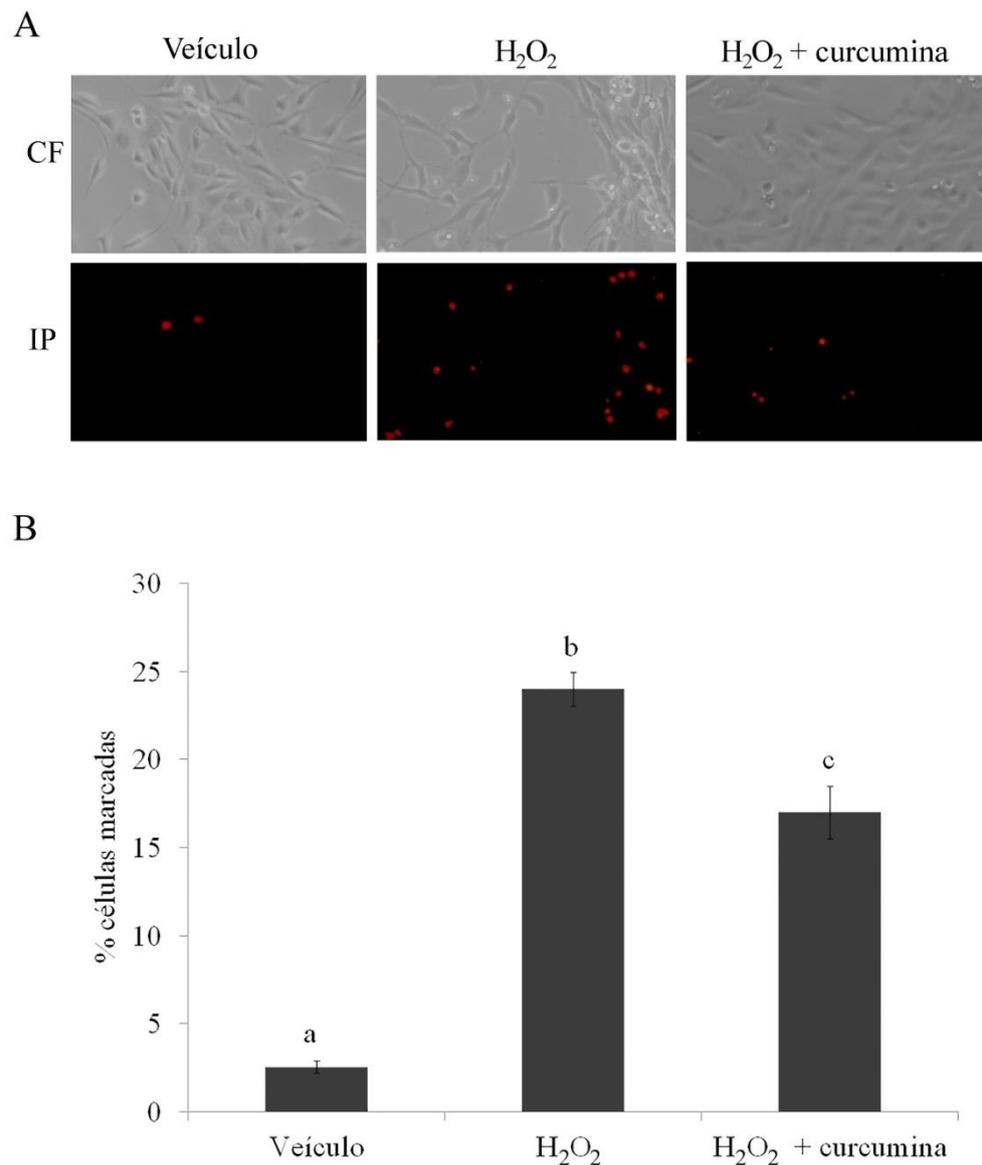


Figura 6. Efeito da curcumina na proteção contra a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio. Células astrogliais C6 foram pré-tratadas com 15 μ M de curcumina em DMEM sem SFB durante 1 h e, após, 50 μ M de peróxido de hidrogênio foi adicionado ao meio por 24 h. Ao final do tratamento, a integridade celular foi analisada por meio da incorporação de iodeto de propídio. Em A, campos representativos de cada grupo experimental observadas em contraste de fase (CF) ou fluorescência (IP), observados em um aumento de 100X. Em B, a quantificação da morte celular, expressa em % de células marcadas em relação ao total de três experimentos realizados em triplicata.

4.4.2. Translocação de NF κ B

Por meio da técnica de imunocitoquímica, foi constatado que a IL-1 β foi capaz de aumentar a translocação do fator de transcrição NF κ B para o núcleo, confirmando seu efeito inflamatório. Foi realizado um pré-tratamento durante 1 h com curcumina na concentração de 15 μ M a fim de mimetizar um efeito de proteção nas células astrogliais. Após o pré-tratamento, as células permaneceram mais 1 h com o estímulo inflamatório, a IL-1 β . Nessas

condições, uma diminuição parcial do conteúdo de NFkB foi observada, indicando uma diminuição parcial na inflamação induzida por IL-1 β (Figura 7).

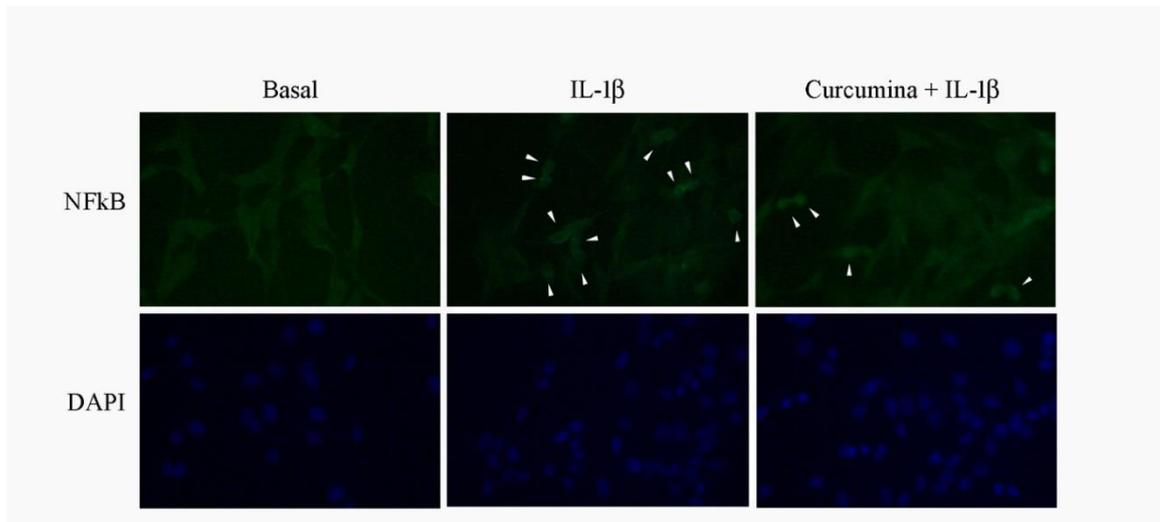


Figura 7. Efeito da curcumina na proteção contra a inflamação induzida por IL-1 β . Células astrogliais C6 foram pré-tratadas com 15 μ M de curcumina em DMEM sem SFB durante 1 h e, após, 10 ng/mL de IL-1 β foi adicionada ao meio por 1 h. Ao final do tratamento, uma imunocitoquímica para NFkB e a coloração dos núcleos por DAPI foram realizadas. A imagem representa um campo representativo de cada grupo experimental de um único experimento realizado em triplicata. Os dados ainda não foram analisados estatisticamente, devido à necessidade de um aumento do número amostral.

5. Discussão

A utilização da curcumina como composto anti-inflamatório e antioxidante tem sido estudada por meio das várias vias que podem estar envolvidas com seus efeitos. Porém, no SNC, são poucos estudos que avaliam suas características, bem como seus possíveis efeitos protetores. Com esse objetivo, começamos nosso estudo com testes de viabilidade celular para determinar a concentração de uso. Em nosso estudo, não foi evidenciada toxicidade da curcumina em nenhuma das concentrações testadas, sendo elas 5, 10, 15 e 20 μ M. As concentrações foram escolhidas com base na revisão de literatura, sendo que a concentração mais utilizada para avaliar parâmetros astrogliais é a de 15 μ M (SCAPAGNINI *et al.*, 2002; AMBEGAOKAR *et al.*, 2003; LAVOIE *et al.*, 2009; GUI *et al.*, 2013). Através das técnicas de MTT e VN, as células demonstraram ser viáveis até a concentração máxima utilizada. Em outros estudos, culturas primárias de astrócitos tratadas com até 100 μ M de curcumina não foram prejudicadas quanto à viabilidade celular, indicando que concentrações inferiores a essa são seguras (LAVOIE *et al.*, 2009). Já outros estudos demonstram que a viabilidade é prejudicada em concentrações mais baixas do que 100 μ M, ainda em culturas primárias de astrócito. Para Gui *et al.*, concentrações de 30 e 50 μ M demonstraram diminuir a viabilidade

em comparação ao basal, através da técnica de MTT. Ainda sobre essas concentrações, foi evidenciado aumento da enzima lactato desidrogenase, liberada pela célula quando a mesma está passando por processos prejudiciais que afetam suas condições basais, como lesões agudas ou danos crônicos. Por fim, também foi observado que com 30 e 50 μM as células tiveram alterações em sua morfologia, além de seus processos estarem reduzidos em tamanho e número (GUI *et al.*, 2013). Esses dados reforçam a segurança das doses utilizadas em nosso estudo, confirmando que a curcumina, até 20 μM não é prejudicial à célula.

Em nossos resultados, encontramos um aumento na concentração intracelular de GSH nas concentrações mais altas dentre as testadas (15 e 20 μM). Apesar de o número de estudos avaliando o aumento de GSH, um importante agente antioxidante do SNC, em astrócitos ser limitado, Lavoie *et al* demonstrou que a curcumina induz a expressão de genes que atuam como chave na síntese de GSH, o que aumenta a síntese da mesma em astrócitos e neurônios. É importante ressaltar que a síntese de GSH depende de dois processos enzimáticos: a ligação de glutamato à cisteína, catalisada pela enzima glutamato cisteína ligase (GCL) e o agrupamento de c-glutamilcisteína com glicina, catalisado pela enzima GSH sintetase (GSS). A GCL ainda conta com duas subunidades, GCLM e GCLC. Um estudo mostrou que culturas primárias de astrócitos tratadas por 24 h com 10 μM de curcumina foram capazes de aumentar a expressão de GCLM e GSS combinada a um aumento do conteúdo intracelular de GSH, enquanto que 50 μM da mesma aumentou em nível de RNA mensageiro os genes Nrf2, xCT, 4F2, GCLC, além de GCLM e GSS. Ainda, em 50 μM , foi evidenciado o maior aumento no conteúdo intracelular de GSH. Apesar da diferença entre o modelo celular utilizado, as concentrações de curcumina utilizadas vão de encontro aos nossos resultados, que evidenciam aumento no conteúdo de GSH em 15 e 20 μM , tratadas também em 24 h. Os dados evidenciados no estudo citado anteriormente reforçam que entre 10 e 50 μM , o aumento de GSH é possível devido ao aumento da expressão gênica de proteínas chave para a indução de síntese de GSH. No mesmo estudo, ainda foram testados quercetina e tert-Butilohidroquinona, substâncias também conhecidas por aumentar o conteúdo intracelular de GSH, logo, promover proteção contra o estresse oxidativo em diferentes tipos celulares. Dentre essas, a curcumina ainda foi a que aumentou a síntese de GSH de forma mais expressiva, tanto em astrócitos quanto em neurônios, reforçando a importância em estudar esse composto na prevenção de doenças neurodegenerativas (LAVOIE *et al.*, 2009).

Quanto às vias bioquímicas envolvidas no processo de aumento intracelular de GSH, além do aumento da expressão de genes envolvidos no sistema de defesa da mesma, Stridh *et al*

cita o papel das junções gap no astrócito (STRIDH *et al.*, 2008). A fim de investigar rotas pelas quais a curcumina aumentaria o conteúdo intracelular de GSH, o mesmo grupo de pesquisa realizou um tratamento em cultura de astrócito tratadas com 30 μM de curcumina, também por 24 h, e como resultado foi evidenciado um aumento da GSH. Quando as células foram tratadas com carbenoxolona, um inibidor das junções gap, o efeito da curcumina foi diminuído, sustentando a hipótese da participação dessa rota (STRIDH *et al.*, 2010). Mesmo que o desenho experimental desse estudo seja semelhante ao nosso, incluindo a concentração testada, e que o resultado seja semelhante é importante ressaltar que as células C6 possuem uma baixa comunicação por junções gap (TABERNERO *et al.*, 2006). Dessa forma, imaginamos que esse não seja o único mecanismo responsável pelo aumento de GSH observado.

Já em um modelo animal, a curcumina também parece ter efeito neuroprotetor através do aumento de GSH intracelular. Um estudo realizou um ensaio *in vivo*, no qual o conteúdo de GSH foi analisado em situação de isquemia cerebral de 10 minutos. Os animais receberam curcumina a uma dose de 200 mg/Kg imediatamente após a reperfusão, 3 h depois e 24 h depois. A curcumina foi administrada durante sete dias consecutivos, tempo necessários para a perfusão. O conteúdo de GSH foi analisado em fatias de hipocampo, e, como resultados, a curcumina foi eficaz em manter a concentração de GSH em ratos isquêmicos semelhante à concentração encontrada em ratos que não foram submetidos à isquemia. Essa reversão seguiu nas 3 e 24 h após a reperfusão. Ainda, os ratos isquêmicos e não expostos à curcumina tiveram diminuição na quantidade de enzimas envolvidas no combate ao estresse oxidativo, superóxido dismutase (SOD) e catalase, e a curcumina se mostrou eficaz em reverter esse parâmetro nos grupos de ratos isquêmicos. Com a isquemia, o dano causado nos tecidos gera aumento de ERO, causando estresse oxidativo, o que tende a diminuir os níveis de enzimas antioxidantes como a SOD e a catalase. Esse evento pode ser explicado pelo fato de que as ERO atacam os sítios das enzimas antioxidantes, ou as consomem, e o mesmo pode acontecer com a GSH. Isso explica o fato de os ratos isquêmicos apresentarem uma diminuição nesses parâmetros antioxidantes, e reforça o papel da curcumina como protetora não apenas na prevenção, mas na reversão de lesões ao tecido. Nesse estudo, a curcumina sozinha não aumentou os níveis intracelulares de GSH, porém, foi crucial na reversão de danos causados pela privação de oxigênio (AL-OMAR *et al.*, 2006). Ainda são limitadas as evidências quanto à ação da curcumina na GSH, principalmente em parâmetros astrogliais, o que suporta a necessidade de mais estudos para que as rotas bioquímicas sejam investigadas.

Ainda em relação à proteção antioxidante, observamos uma capacidade da curcumina em prevenir a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio, uma ERO. Essa ação na prevenção de danos já havia sido demonstrada em estudos com células tronco e células de câncer pancreático, porém, novamente, a investigação em células do SNC é pequena (CAO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016). Um estudo testou a capacidade da curcumina em impedir a ativação de astrócitos, evento danoso em um quadro patológico, pois quando ativados, os astrócitos tem a capacidade de secretar fatores neurotróficos e iniciar respostas que podem levar à morte neuronal, por exemplo. Como resultados, a curcumina impediu que houvesse um aumento de marcadores de astrócitos envolvidos nessa resposta, o que corrobora nossos resultados (DAVEREY; AGRAWAL, 2016). O aumento intracelular de GSH e a prevenção da morte induzida por peróxido de hidrogênio mostram que a importância desse composto como antioxidante no SNC e suas patologias são razões para que a curcumina seja estudada de forma mais profunda.

Outro marcador de astrócitos, importante enzima investigada por nós, foi a GS, atuante na detoxificação da amônia, bem como na prevenção da excitotoxicidade do glutamato, reciclando o mesmo para o neurônio (BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009). Ambegaokar encontrou uma diminuição da atividade da GS em células C6 na concentração de 15 μM (AMBEGAOKAR *et al.*, 2003). Entretanto, não encontramos alterações na atividade da GS nas concentrações de curcumina estudadas isoladamente. Porém, não podemos descartar a possibilidade de que se as células fossem expostas a um estímulo danoso, a curcumina poderia ter efeito aumentando a atividade dessa enzima.

Em nossos ensaios de proteção de parâmetros inflamatórios, a curcumina demonstrou inibir parcialmente a inflamação causada por IL-1 β , através da observação de NFkB translocada ao núcleo. A indução de inflamação em células C6 pela IL-1 β já foi demonstrada em trabalhos prévios de nosso grupo (DE SOUZA *et al.*, 2009). Como já comentado, a curcumina demonstrou ter propriedades anti-inflamatórias, incluindo a translocação de NFkB em diversos tipos celulares (AGGARWAL *et al.*, 2013). Em um estudo com células endoteliais, foi realizado um pré-tratamento com curcumina por 1 h nas concentrações de 20, 40, 60 e 80 μM , e depois expostas a 0,1 nM de TNF por 30 min. A curcumina inibiu a ativação de NFkB de forma dependente de concentração, sendo que na concentração de 40 μM a supressão chegou a 90% (KUMAR *et al.*, 1998). Já em células mielóides com o mesmo desenho experimental, 40 e 60 μM foram capazes de inibir a capacidade do TNF em ativar o NFkB (SINGH; AGGARWAL, 1995). Porém, sua ação no SNC ainda é pouco investigada.

Em cultura de astrócitos, um único estudo realizou um pré-tratamento com curcumina, e após, uma exposição com IL-1 10 ng/mL por 30 min. Como resultado, a curcumina atenuou a ativação de NFkB, medida através de sua ligação ao DNA, em relação ao estímulo inflamatório sozinho (WITEK-ZAWADA; KOJ, 2003). Apesar de nesse estudo os autores não relatarem a concentração de curcumina utilizada, os resultados encontrados corroboram nossos achados preliminares. Para maiores conclusões, deve-se aumentar o número de experimentos a fim de confirmar as doses utilizadas e os efeitos encontrados.

A curcumina, apesar de demonstrar efeitos significativos *in vitro* e *in vivo*, possui uma limitação quanto a sua biodisponibilidade oral. Após ingerida, passa por extensa glicuronidação e sulfatação intestinal, além de se ligar a inúmeras proteínas no soro, incluindo a albumina (BEGUM *et al.*, 2008; AGGARWAL *et al.*, 2013). Esses e outros processos têm sido levados em consideração para os testes terapêuticos, de modo que cada vez mais surgem estudos com alternativas para aumentar sua biodisponibilidade, como ingestão associada à lipossomas (JURENKA, 2009). Outra alternativa é o estudo de alguns dos metabólitos da curcumina encontrados no plasma após sua ingestão, como tetrahydrocurcumina, hexacurcuminacurcumina, monoacetilcurcumina e octahydrocurcumina. Dentre esses, a mais explorada pelos estudos tem sido a tetrahydrocurcumina por ser o metabólito primário. Porém, os estudos ainda são controversos quanto sua atividade em relação à curcumina livre (ZHAO *et al.*, 2015). Ainda, a ingestão concomitante de piperina, composto encontrado na pimenta preta parece aumentar sua biodisponibilidade no soro em cerca de 20 vezes (SHOBA *et al.*, 1998).

Apesar da baixa biodisponibilidade, efeitos em estudos com humanos têm sido notados principalmente no que diz respeito à diminuição de citocinas pró-inflamatórias em concentrações aproximadas a 4 g/dia (AGGARWAL *et al.*, 2013). Entretanto, quanto à passagem pela barreira hemato-encefálica e ação no cérebro, já foi demonstrado que a curcumina tem mais facilidade na passagem em comparação aos seus metabólitos. Essa passagem e a passagem por outras membranas celulares são possibilitadas por sua estrutura lipofílica (SEYEDZADEH *et al.*, 2014). Vale ressaltar que a passagem do plasma para o cérebro é limitado devido à glicuronidação sofrida pelos compostos curcuminóides (BEGUM *et al.*, 2008). Mesmo com suas limitações quanto à biodisponibilidade, a curcumina demonstra efeitos neuroprotetores ainda pouco discutidos na literatura. A fim de conhecer melhor esse composto e seu potencial na prevenção e reversão de danos neurológicos, mais estudos devem ser realizados.

6. Conclusão

Nossos dados mostraram que a curcumina, em cultura de células C6, foi capaz de aumentar o conteúdo de GSH, o que provavelmente está relacionado com a proteção à morte celular induzida por peróxido de hidrogênio observada. Os dados desse trabalho reforçam a ideia de que a curcumina é um promissor agente protetor para o SNC.

7. Referências Bibliográficas

AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. C.; SUNG, B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. **Br J Pharmacol**, v. 169, n. 8, p. 1672-92, Aug 2013. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23425071> >.

AL-OMAR, F. A. et al. Immediate and delayed treatments with curcumin prevents forebrain ischemia-induced neuronal damage and oxidative insult in the rat hippocampus. **Neurochem Res**, v. 31, n. 5, p. 611-8, May 2006. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16770732> >.

ALAM, Q. et al. Inflammatory Process in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Central Role of Cytokines. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 5, p. 541-8, 2016. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26601965> >.

AMBEGAOKAR, S. S. et al. Curcumin inhibits dose-dependently and time-dependently neuroglial cell proliferation and growth. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 24, n. 6, p. 469-73, Dec 2003. ISSN 0172-780X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073579> >.

BEGUM, A. N. et al. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 326, n. 1, p. 196-208, Jul 2008. ISSN 1521-0103. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417733> >.

BENDA, P. et al. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**, v. 161, n. 3839, p. 370-1, Jul 1968. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4873531> >.

BROWN, G. C.; BAL-PRICE, A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. **Mol Neurobiol**, v. 27, n. 3, p. 325-55, Jun 2003. ISSN 0893-7648. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12845153> >.

BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 11, n. 3, p. 281-95, 2009. ISSN 1294-8322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19877496> >.

CAO, L. et al. Curcumin inhibits H₂O₂-induced invasion and migration of human pancreatic cancer via suppression of the ERK/NF- κ B pathway. **Oncol Rep**, v. 36, n. 4, p. 2245-51, Oct 2016. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27572503> >.

CHAN, K. et al. Loss of function mutation of the Slc38a3 glutamine transporter reveals its critical role for amino acid metabolism in the liver, brain, and kidney. **Pflugers Arch**, v. 468, n. 2, p. 213-27, Feb 2016. ISSN 1432-2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26490457> >.

DAVEREY, A.; AGRAWAL, S. K. Curcumin alleviates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in astrocytes. **Neuroscience**, v. 333, p. 92-103, Oct 2016. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27423629> >.

DE SOUZA, D. F. et al. S100B secretion is stimulated by IL-1 β in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. **J Neuroimmunol**, v. 206, n. 1-2, p. 52-7, Jan 2009. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19042033> >.

FRAUTSCHY, S. A. et al. Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of A β -induced cognitive deficits and neuropathology. **Neurobiol Aging**, v. 22, n. 6, p. 993-1005, 2001 Nov-Dec 2001. ISSN 0197-4580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11755008> >.

GEGG, M. E. et al. Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? **J Neurochem**, v. 86, n. 1, p. 228-37, Jul 2003. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807442> >.

GUERRA, M. C. et al. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 128, 2011. ISSN 1742-2094. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21970823> >.

GUI, H. Y. et al. Curcumin Protects against 1-Methyl-4-phenylpyridinium Ion- and Lipopolysaccharide-Induced Cytotoxicities in the Mouse Mesencephalic Astrocyte via Inhibiting the Cytochrome P450 2E1. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 523484, 2013. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843878> >.

HE, Y. et al. Interleukin-1 β protects astrocytes against oxidant-induced injury via an NF- κ B-dependent upregulation of glutathione synthesis. **Glia**, v. 63, n. 9, p. 1568-80, Sep 2015. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25880604> >.

JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. **Altern Med Rev**, v. 14, n. 2, p. 141-53, Jun 2009. ISSN 1089-5159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19594223> >.

KUMAR, A. et al. Curcumin (Diferuloylmethane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor- κ B activation. **Biochem Pharmacol**, v. 55, n. 6, p. 775-83, Mar 1998. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9586949> >.

LAVOIE, S. et al. Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. **J Neurochem**, v. 108, n. 6, p. 1410-22, Mar 2009. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19183254> >.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713> >.

MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 354, n. 1387, p. 1155-63, Jul 1999. ISSN 0962-8436. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10466143> >.

MANGOURA, D. et al. Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. **Neurochem Res**, v. 14, n. 10, p. 941-7, Oct 1989. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2575233> >.

MORALES, I. et al. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 112, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24795567> >.

PARKER, K. K.; NORENBURG, M. D.; VERNADAKIS, A. "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. **Science**, v. 208, n. 4440, p. 179-81, Apr 1980. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6102413> >.

PARPURA, V. et al. Glial cells in (patho)physiology. **J Neurochem**, v. 121, n. 1, p. 4-27, Apr 2012. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22251135> >.

PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 8, p. 421-31, Aug 2009. ISSN 1878-108X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19615761> >.

PEREIRA, R. C. A.; MOREIRA, M. R. **Cultivo de Curcuma longa L. (Açafrão-da-índia ou Cúrcuma)**. 142 1-2 p. 2009.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83, n. 2, p. 346-56, Dec 1977. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/603028> >.

RANSOM, B. R.; RANSOM, C. B. Astrocytes: multitasking stars of the central nervous system. **Methods Mol Biol**, v. 814, p. 3-7, 2012. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22144296> >.

SCAPAGNINI, G. et al. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. **Mol Pharmacol**, v. 61, n. 3, p. 554-61, Mar 2002. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11854435> >.

SCAPAGNINI, G.. et al. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. **Mol**

Neurobiol, v. 44, n. 2, p. 192-201, Oct 2011. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499987> >.

SEYEDZADEH, M. H. et al. Study of curcumin immunomodulatory effects on reactive astrocyte cell function. **Int Immunopharmacol**, v. 22, n. 1, p. 230-5, Sep 2014. ISSN 1878-1705. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24998635> >.

SHOBA, G. et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Med**, v. 64, n. 4, p. 353-6, May 1998. ISSN 0032-0943. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9619120> >.

SINGH, S.; AGGARWAL, B. B. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. **J Biol Chem**, v. 270, n. 42, p. 24995-5000, Oct 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559628> >.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 1, p. 7-35, Jan 2010. ISSN 1432-0533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012068> >.

STRIDH, M. H. et al. Enhanced glutathione efflux from astrocytes in culture by low extracellular Ca²⁺ and curcumin. **Neurochem Res**, v. 35, n. 8, p. 1231-8, Aug 2010. ISSN 1573-6903. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20437093> >.

STRIDH, M.H. et al. Stimulated efflux of amino acids and glutathione from cultured hippocampal slices by omission of extracellular calcium: likely involvement of connexin hemichannels. **J Biol Chem**, v. 283, n. 16, p. 10347-56, Apr 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272524> >.

TABERNERO, A.; MEDINA, J. M.; GIAUME, C. Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. **J Neurochem**, v. 99, n. 4, p. 1049-61, Nov 2006. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899068> >.

USHARANI, P. et al. Effect of NCB-02, atorvastatin and placebo on endothelial function, oxidative stress and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, parallel-group, placebo-controlled, 8-week study. **Drugs R D**, v. 9, n. 4, p. 243-

50, 2008. ISSN 1174-5886. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588355> >.

VAREED, S. K. et al. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 6, p. 1411-7, Jun 2008. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559556> >.

WANG, D. D.; BORDEY, A. The astrocyte odyssey. **Prog Neurobiol**, v. 86, n. 4, p. 342-67, Dec 2008. ISSN 0301-0082. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18948166> >.

WANG, N. et al. Curcumin protects human adipose-derived mesenchymal stem cells against oxidative stress-induced inhibition of osteogenesis. **J Pharmacol Sci**, Oct 2016. ISSN 1347-8648. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27840063> >.

WITEK-ZAWADA, B.; KOJ, A. Regulation of expression of stromelysin-1 by proinflammatory cytokines in mouse brain astrocytes. **J Physiol Pharmacol**, v. 54, n. 4, p. 489-96, Dec 2003. ISSN 0867-5910. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726605> >.

ZHAO, F. et al. Curcumin and its major metabolites inhibit the inflammatory response induced by lipopolysaccharide: translocation of nuclear factor- κ B as potential target. **Mol Med Rep**, v. 11, n. 4, p. 3087-93, Apr 2015. ISSN 1791-3004. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25502175> >.