

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Marina Pedra Seady

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA CURCUMINA NA NEUROINFLAMAÇÃO
INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Porto Alegre

2023

Marina Pedra Seady

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA CURCUMINA NA NEUROINFLAMAÇÃO
INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marina Concli Leite

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Seady, Marina Pedra
Investigação do Papel da Curcumina na
Neuroinflamação Induzida por Lipopolissacarídeo /
Marina Pedra Seady. -- 2023.
100 f.
Orientadora: Marina Concli Leite.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Curcumina. 2. Piperina. 3. LPS. 4.
Neuroinflamação. 5. Astrócitos. I. Leite, Marina
Concli, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À mim mesma, pela motivação e dedicação.

Ao meu psicólogo Cristofer, por me ajudar a entender que minha tese de doutorado é uma parte importante da minha história, mas não define meu valor como pessoa.

Aos meus pais, Hamilton e Andréa, pelo incentivo, força, colo e amor incondicional.

Ao meu irmão, Matheus, pelo apoio e alívio cômico.

Ao meu esposo, Rafael, pela paciência, apoio, incentivo e compreensão.

Aos meus colegas Gabriel, Fê Fróes, Jéssica Taday, Jéssica Souza e Jéfeli, por toda a ajuda prática no laboratório, mas também por validarem meus sentimentos frente a todos os nuances da montanha russa de emoções que foram os últimos anos. Sem meus colaboradores, o trabalho não seria nem 10% do que é.

À minha orientadora, Marina, que eu observei dar aula há quase 10 anos atrás e pensei “quero ser assim”. Por escutar minhas palavras, choros e risadas, por discutir resultados, aconselhar e apoiar desde a ideia de fazer pós-doutorado fora até a divulgação do fatídico Tik Tok que viralizou.

RESUMO

A neuroinflamação é uma característica central de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson. No sistema nervoso central (SNC), a resposta inflamatória é realizada por células da glia, com destaque aos astrócitos e a microglia. Os astrócitos, além de responsáveis pela manutenção da barreira hematoencefálica (BHE), homeostase iônica, metabolismo energético, metabolismo glutamatérgico e proteção antioxidante em condições fisiológicas, atuam como protagonistas na resposta inflamatória. Durante a neuroinflamação, os astrócitos, modulam o fluxo sanguíneo, diminuem o suporte trófico aos neurônios, aumentam a infiltração de células imunes e amplificam as respostas inflamatórias por meio da regulação positiva da produção de citocinas. Diversas moléculas têm sido propostas para atenuar a resposta inflamatória no contexto de doenças cerebrais, com destaque aos compostos bioativos. Na busca por compostos bioativos candidatos a exercer um papel anti-inflamatório que poderiam agir tanto de uma forma protetora, ou seja, em conjunto com hábitos de vida saudáveis para reduzir riscos de saúde futuros, quanto como alvo da tecnologia farmacêutica para dar origem a novos medicamentos, se destaca a curcumina. A curcumina é um polifenol presente na *Curcuma longa*, com capacidade anti-inflamatória e antioxidante bem descrita em tecidos periféricos, mas pouco explorada em células do SNC. Apesar de sua baixa biodisponibilidade, a curcumina é capaz de atravessar a BHE. Por esse motivo, o primeiro objetivo desta tese foi caracterizar os efeitos da curcumina e da piperina, uma molécula presente na pimenta preta, com possível efeito sinérgico à curcumina, em culturas primárias de astrócitos em condições basais e inflamatórias. O segundo objetivo foi investigar os efeitos da administração oral de curcumina em um modelo de neuroinflamação em ratos, induzido por uma injeção de lipopolissacarídeo (LPS) intracerebroventricular, para avaliar se os efeitos encontrados em astrócitos seriam reproduzíveis em modelo animal. Nossos resultados mostraram que a curcumina foi capaz de modular funções de astrócitos mesmo em condições basais, aumentando o conteúdo de GSH e GFAP, além de reduzir a secreção de S100B. Em condições inflamatórias provocadas por LPS, tanto a curcumina quanto a piperina reduziram a secreção de TNF- α , mostrando um importante efeito anti-inflamatório. Apenas a piperina reverteu o aumento de GFAP causado pelo LPS, enquanto a curcumina potencializou o efeito do LPS no que diz respeito à secreção de S100B. Nossos resultados em um modelo animal de neuroinflamação demonstraram que a curcumina foi capaz de atenuar o déficit locomotor causado pelo LPS, mesmo não reduzindo a perda de peso, redução do consumo hídrico e anedonia observados no modelo. Além disso, a curcumina reduziu a sinalização inflamatória através da redução do conteúdo de IL-1 β e imunocônteúdo de COX-2 e Iba-1 no tecido hipocampal, reforçando o efeito anti-inflamatório observado no modelo *in vitro*. Por fim, a curcumina administrada via oral foi capaz de reduzir o conteúdo de S100B no líquido cefalorraquidiano e reestabelecer a proteção antioxidante através do aumento do conteúdo de GSH, ambos parâmetros afetados pela administração central de LPS. Nossos resultados reforçam o efeito anti-inflamatório da curcumina e o potencial terapêutico desta molécula. Além disso, destacamos que os astrócitos são parte importante da ação da curcumina, portanto, novos estudos investigando alvos moleculares da curcumina em astrócitos devem ser realizados, especialmente no que diz respeito à sinalização da proteína S100B.

ABSTRACT

Neuroinflammation is a central feature of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease. In the central nervous system (CNS), the inflammatory response is carried out by glial cells, especially astrocytes and microglia. Astrocytes are not only responsible for maintaining the blood-brain barrier integrity (BBB), ionic homeostasis, energy metabolism, glutamatergic metabolism, and antioxidant protection under physiological conditions but act as protagonists in the inflammatory response. During neuroinflammation, astrocytes modulate blood flow, decrease trophic support to neurons, increase immune cell infiltration, and amplify responses through upregulation of cytokine production. Several molecules have been proposed to attenuate inflammation in the context of brain disease, such as bioactive compounds. In the search for candidate bioactive compounds to exert anti-inflammatory protection that could act both in a preventive way, that is, in conjunction with healthy living habits to reduce future health risks, and as a target of pharmaceutical technology to develop new medicines, curcumin stands out. Curcumin is a polyphenol present in *Curcuma longa*, with well described anti-inflammatory and antioxidant capacity in peripheral tissues. Despite its low bioavailability, curcumin is able to cross the BBB. For this reason, the first objective of this thesis was to characterize the effects of curcumin and piperine, a molecule found in black pepper with possible synergistic effects with curcumin, in primary cultures of astrocytes under basal and inflammatory conditions. The second objective was to investigate the effects of oral administration of curcumin in an animal model of neuroinflammation, induced by an intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide (LPS), to assess whether the effects found in astrocytes would be reproducible in an animal model. Our results demonstrated that curcumin was able to modulate astrocyte functions under basal conditions, increasing the content of GSH and GFAP, in addition to reducing the secretion of S100B. In inflammatory conditions provoked by LPS, both curcumin and piperine reduced the secretion of TNF- α , showing an important anti-inflammatory effect. Only piperine reversed the increase in GFAP caused by LPS, while curcumin potentiated the effect of LPS with regard to the secretion of S100B. In our animal model of neuroinflammation, curcumin was able to attenuate the locomotor deficit caused by LPS, even though it did not attenuate weight loss, reduced water consumption, and anhedonia. Furthermore, curcumin reduced inflammatory signaling by reducing the content of IL-1 β and the immunocontent of COX-2 and Iba-1 in the hippocampus, reinforcing the anti-inflammatory effect observed in the *in vitro* model. Finally, orally administered curcumin was able to reduce the content of S100B in the cerebrospinal fluid and restore antioxidant protection by increasing the content of GSH, both parameters affected by the central administration of LPS. Our results reinforce the anti-inflammatory effect of curcumin and the therapeutic potential of this molecule. Furthermore, we emphasize that astrocytes play an important role in the activity of curcumin, therefore, further studies investigating molecular targets of curcumin in astrocytes should be carried out, especially regarding S100B protein signaling.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| Lista de abreviaturas | 3 |
| 1. Introdução..... | 4 |
| 1.1. Inflamação | 4 |
| 1.2. Neuroinflamação | 6 |
| 1.3. LPS como modelo de neuroinflamação | 7 |
| 1.4. Células gliais | 8 |
| 1.5. Astrócitos | 9 |
| 1.5.1. Proteínas marcadoras | 10 |
| 1.5.2. Funções..... | 11 |
| 1.5.2.1. Metabolismo glutamatérgico..... | 11 |
| 1.5.2.2. Proteção antioxidante | 12 |
| 1.5.2.3. Resposta inflamatória | 13 |
| 1.6. Curcumina | 13 |
| 1.6.1. Estrutura | 14 |
| 1.6.2. Biodisponibilidade..... | 15 |
| 1.6.3. Passagem pela barreira hematoencefálica | 15 |
| 1.6.4. Atividade antioxidante..... | 16 |
| 1.6.5. Atividade anti-inflamatória | 17 |
| 1.7. Piperina | 18 |
| 2. Justificativa..... | 19 |
| 2.1. Objetivo geral | 20 |
| 2.2. Objetivos específicos | 20 |
| 3. Resultados | 21 |
| 3.1. Capítulo I | 21 |
| 3.2. Capítulo II..... | 48 |
| 4. Discussão | 73 |
| 4.1. Curcumina modula funções astrocíticas em condições basais e inflamatórias..... | 73 |
| 4.1.1. Efeito da curcumina e piperina em astrócitos em condições basais | 73 |
| 4.1.2. Efeito da curcumina e piperina isoladas ou em combinação sob a sinalização inflamatória causada por lipopolissacarídeo | 76 |
| 4.2. Curcumina atenua o dano neuroinflamatório induzido por uma injeção intracerebroventricular de lipopolissacarídeo..... | 79 |
| 4.2.1. Curcumina atinge o sistema nervoso central após administração via gavagem | 79 |

| | | |
|--|--|----|
| 4.2.2. | Efeitos protetores da curcumina 24 e 48 horas após a administração central de LPS | 80 |
| 4.2.3. | Caracterização bioquímica do dano inflamatório causado por lipopolissacarídeo, bem como efeitos protetores da curcumina 72 horas após a administração central de LPS | 82 |
| 5. | Considerações finais | 85 |
| 6. | Conclusões | 87 |
| 7. | Perspectivas futuras | 87 |
| 8. | Apoio financeiro | 88 |
| 9. | Referências bibliográficas | 88 |
| Anexo I – Carta de aprovação da comissão no uso de animais do capítulo I | | 94 |
| Anexo II – Carta de aprovação da comissão no uso de animais do capítulo II | | 95 |

Lista de abreviaturas

BHE – barreira hematoencefálica

COX – ciclooxigenase

DA – doença de Alzheimer

DAMPs - padrões moleculares associados a danos

GCL - glutamato cisteína ligase

GFAP - proteína glial fibrilar ácida

GS – glutamina sintetase

Iba-1 - molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado

ICV – intracerebroventricular

IL-1 β – interleucina 1 β

IL-6 – interleucina-6

IP - intraperitoneal

LCR - líquido cefalorraquidiano

LDH - lactato desidrogenase

LPS – lipopolissacarídeo

NRF2 - fator nuclear eritróide 2

NF κ B – fator nuclear kappa B

PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos

RRPs - receptores de reconhecimento de padrões

SNC – sistema nervoso central

TLR - receptores do tipo toll

TNF- α – fator de necrose tumoral α

1. Introdução

1.1. Inflamação

A inflamação é um processo biológico que ocorre em cooperação com células do sistema imune como resposta a estímulos infecciosos, como vírus e bactérias, ou não-infecciosos, como células danificadas. O processo inflamatório agudo é vital para que seja reestabelecida a homeostase de um organismo, e ocorre em 3 grandes etapas: identificação, sinalização e resolução (CHEN et al., 2018).

A resposta inflamatória se inicia com o reconhecimento do estímulo danoso pelo organismo, realizado majoritariamente pelos receptores de reconhecimento de padrões (RRPs). Os RRP são expressos por célula do sistema imune inato, como os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, e também por células não-imunes, como adipócitos e hepatócitos. Como células do sistema imune inato e células não-imunes não possuem a mesma especificidade de células do sistema imune adaptativo para reconhecer antígenos específicos, elas contam com os RRP para identificar estímulos danosos que ameaçam a homeostase do organismo. Dentre os RRP, se encontram os receptores do tipo NOD, receptores do tipo RGI, receptores de lecitina tipo C, receptores do tipo AIM2, e, um dos primeiros a serem descobertos e mais importantes RRPS, os receptores do tipo Toll (TLR) (LI; WU, 2021).

O TLRs são receptores localizados na membrana celular das células de vertebrados, e são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Após o reconhecimento do estímulo danoso, os TLRs ativam uma cascata de sinalização intracelular que levam a translocação para o núcleo de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NFκB). O NFκB é um fator de transcrição que, em condições celulares basais, está ligado a proteína IκB. Após um estímulo inflamatório reconhecido pelos TLRs, a enzima IκB cinase-α é ativada, degradando a proteína IκB. Dessa

forma, o NFκB é translocado para o núcleo, onde ativa a transcrição genética de proteínas sinalizadoras de inflamação, como as citocinas inflamatórias (CHEN et al., 2018), que modulam a sinalização inflamatória de forma que ela seja amplificada, ou então, reduzida. Citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1β (IL-1β), o fator de necrose tumoral α (TNF-α) e a interleucina-6 (IL-6), são responsáveis por estimular proliferação de células natural killer, a fagocitose celular e a produção de anticorpos IgG por linfócitos B. Sendo assim, a produção de citocinas pró-inflamatórias é crucial e determinante para que a resposta inflamatória e a resposta do sistema imune sejam suficientes para combater o estímulo que causou a cascata inflamatória (TURNER et al., 2014). Além do papel pró-inflamatório das citocinas, outras moléculas também atuam na sinalização da inflamação, como os metabólitos derivados do ácido araquidônico.

O ácido araquidônico é um ácido graxo insaturado presente nas membranas celulares. Durante um evento inflamatório, é liberado da membrana e clivado por enzimas chamadas de ciclooxigenases (COX), dando origem a prostaglandinas. As prostaglandinas possuem efeito vasodilatador, além de mediar a sinalização de dor (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Tanto as citocinas pró-inflamatórias quanto as prostaglandinas atuam de forma a facilitar o recrutamento de células do sistema imune para o local onde o dano foi iniciado.

Após a resolução do dano, a produção de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas é reduzida, dando espaço a citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10, bem como mediadores derivados do ácido araquidônico, as lipoxinas e resolvinas (SUGIMOTO et al., 2016). A infiltração de células do sistema imune é reduzida, e o reparo tecidual é iniciado, reestabelecendo a homeostase celular.

Apesar do caráter protetor da resposta inflamatória, em algumas situações, a produção de citocinas inflamatórias é exacerbada, causando efeitos colaterais à longo prazo ou danos

teciduais irreparáveis. Como exemplo, pode ser citado o conjunto de sintomas que caracterizam a Covid Longa, causada pela infecção aguda por Covid-19, que, após resolvida, pode trazer sequelas persistentes como fadiga e dano cognitivo (YONG, 2021).

Além da exacerbação da resposta inflamatória aguda, a inflamação pode causar distúrbios metabólicos quando disparada em caráter crônico. Durante a obesidade, por exemplo, células do tecido adiposo se expandem, causando diferenciação das células do sistema imune circulantes e liberação de mediadores inflamatórios que, embora sejam liberados em menor intensidade do que na resposta inflamatória aguda, são liberados de forma persistente, por mais tempo (GUILLEMOT-LEGRIS; MUCCIOLI, 2017).

1.2. Neuroinflamação

O processo inflamatório iniciado na periferia do organismo pode atingir o sistema nervoso central (SNC). Em modelos de obesidade animal, apenas um dia de dieta rica em gorduras já foi capaz de aumentar a expressão gênica de citocinas inflamatórias no cérebro (WAISE et al., 2015). Porém, em diversas doenças que afetam o cérebro, a neuroinflamação tem início no próprio SNC. É o caso de situações traumáticas, como o traumatismo cranioencefálico, no qual um insulto físico a estrutura cerebral dispara a resposta inflamatória, que medeia o dano tecidual e a morte celular (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016).

A neuroinflamação também é uma característica central de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson. Uma das hipóteses que cerca a patologia da doença de Alzheimer (DA) sugere que a neuroinflamação surge como uma resposta a deposição de peptídeos β -amilóide. Embora a progressão da DA inclua um agravamento da resposta inflamatória, marcadores inflamatórios já foram identificados antes do aparecimento de placas β -amilóide, sugerindo que a resposta inflamatória pode ser determinante para o surgimento, e não só para a evolução da doença (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015).

1.3. LPS como modelo de neuroinflamação

Para investigar o efeito da neuroinflamação no funcionamento do SNC, diversos modelos animais são utilizados. Dentre eles, a administração de lipopolissacarídeo (LPS) se destaca pela capacidade de estimular vias clássicas da resposta inflamatória, bem como a reprodução de sintomas característicos da resposta inflamatória aguda conhecidos como “comportamento doente”.

O LPS é um componente de parede de bactérias gram-negativas, reconhecido pelo receptor transmembrana TLR4. Para que o LPS se ligue ao TLR4, algumas interações com outras proteínas precisam acontecer: primeiramente, o LPS é detectado por uma proteína ligante de LPS, e posteriormente, com ajuda do cluster de identificação 14, é apresentado ao TLR4. Após a apresentação, o LPS finalmente se liga ao TLR4 através da proteína MD-2, que é associada ao domínio de repetição rico em leucina deste receptor (SKRZYPCZAK-WIERCIOCH; SAŁAT, 2022).

A ligação do LPS com o TLR4 dá início a uma cascata de sinalização intracelular que resulta na ativação de fatores de transcrição como $\text{NF}\kappa\text{B}$ e AP-1. Essa ativação aumenta consideravelmente a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas inflamatórias, que são moléculas centrais na sinalização da inflamação no SNC. As citocinas interagem com seus receptores correspondentes, distribuídos por todo o parênquima encefálico. Essa dispersão de citocinas pelo cérebro é determinante para o surgimento de sintomas clássicos da inflamação aguda, como anorexia, perda de peso, prejuízos na função locomotora e anedonia (EISENBERGER et al., 2017).

A administração de LPS pode ser feita na periferia ou diretamente no SNC. Injeções intraperitoneais de LPS são capazes de aumentar a sinalização inflamatória no SNC, bem como causar sintomas de comportamento doente (SORRENTI et al., 2018). Já foi evidenciado que o

LPS é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (VARGAS-CARAVEO et al., 2017). Entretanto, o LPS atinge o SNC em concentrações muito baixas (BANKS; ROBINSON, 2010), e a maior parte da resposta causada pela administração intraperitoneal de LPS é atribuída a sinalizadores inflamatórios, como as citocinas e o óxido nítrico, que atingem o SNC (VARGAS-CARAVEO et al., 2017).

Para uma resposta inflamatória originada diretamente no SNC, é necessário que o LPS seja administrado de forma central. Embora a administração de LPS em estruturas específicas, como intranigral e intraestriatal seja descrita na literatura como uma forma de investigar o dano inflamatório região-específica, a administração central mais comum é a intracerebroventricular (ICV) (SKRZYPCZAK-WIERCIOCH; SAŁAT, 2022).

O sistema ventricular cerebral em ratos e camundongos consiste em 4 ventrículos, sendo 2 laterais, um em cada hemisfério cerebral. Os ventrículos laterais são significativamente maiores do que o terceiro e quarto ventrículo, e consistem em cavidades preenchidas por líquido cefalorraquidiano (LCR), produzido no plexo coroide do próprio ventrículo. Após ser produzido e distribuído pelo sistema ventricular, o LCR segue para o espaço subaracnoide e percorre toda a estrutura cerebral (KANDEL et al., 2014). Por esse motivo, administrar substâncias via ICV é uma alternativa para que elas sejam igualmente distribuídas pelo cérebro inteiro, e não apenas em uma estrutura. A administração ICV de LPS é um modelo de neuroinflamação que causa todos os sintomas clássicos de uma resposta inflamatória aguda, bioquimicamente e também a nível de comportamento animal (DA RÉ et al., 2020; GUERRA et al., 2011).

1.4. Células gliais

Conforme exposto até então nesta tese, a neuroinflamação é uma característica central de doenças cerebrais. Portanto, investigar seus mecanismos e possíveis tratamentos se faz

extremamente relevante. Para que isso aconteça, além de modelos animais de neuroinflamação, investigar células específicas que participam dessa resposta em condições basais e inflamatórias é essencial para compreender o mecanismo da doença, bem como sugerir novos alvos moleculares para estratégias terapêuticas.

O SNC é formado por células neuronais e gliais. Por muitos anos, as células gliais foram consideradas coadjuvantes na função cerebral, vistas meramente como uma malha de sustentação que comporta os neurônios (glia = glue, cola no inglês). Atualmente, as vastas funções das células gliais não permitem que as mesmas sejam tratadas como coadjuvantes, mas sim protagonistas, especialmente no que diz respeito à resposta inflamatória. Dentre as células gliais, estão a microglia e os astrócitos.

A microglia é a representante do sistema imune inato no cérebro. As células da microglia atuam fazendo vigilância ao longo do tecido cerebral, agindo de forma similar aos macrófagos. Durante um insulto físico ou infeccioso, a microglia sofre alterações estruturais, adquirindo um fenótipo pró-inflamatório. Além de alterar o padrão de receptores expressos na superfície celular e produzir citocinas pró-inflamatórias, as células da microglia adotam um formato ameboide, facilitando sua migração para os locais onde o dano foi originado (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016). O aumento do conteúdo da molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba1) é uma forma de caracterizar a ativação da microglia em modelos animais de doenças cerebrais (ROSA et al., 2021; SORRENTI et al., 2018).

1.5. Astrócitos

Os astrócitos são as células mais abundantes do SNC. Seu nome é o resultado da união de duas palavras gregas: *astron* (estrela) e *cyte* (célula), pois quando foram descobertos, sua morfologia era semelhante a uma estrela. Atualmente, os astrócitos são descritos como um grupo heterogêneo de células com características morfológicas divergentes, com destaque para

três principais variações: astrócitos protoplasmáticos, com processos mais curtos e espessos, astrócitos fibrosos, com menos processos, e uma terceira forma mais alongada e com ainda menos processos, representados pelas células de Bergmann e células de Muller. A diversidade e numerosidade dos astrócitos indica sua importância na fisiologia do SNC.

Assim como a microglia, os astrócitos também foram posteriormente reportados como células passivas, com função única de dar suporte aos neurônios. Porém, atualmente, diversas funções astrocíticas já foram elucidadas na literatura. Dentre elas, a manutenção da BHE, homeostase iônica, metabolismo energético, metabolismo glutamatérgico, proteção antioxidante e resposta inflamatória se destacam (PARPURA et al., 2012).

A importância dos astrócitos para a função cerebral passa pela sua posição privilegiada no SNC. Sua estrutura permite que os processos astrocíticos estejam em contato tanto com os terminais sinápticos quanto com os vasos sanguíneos, atuando como um importante sensor energético e metabólico (WANG; BORDEY, 2008).

1.5.1. Proteínas marcadoras

Para facilitar a identificação dos astrócitos no ambiente do SNC, algumas proteínas são utilizadas como marcadoras desse tipo celular. Dentre elas, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) se destaca como marcadora de astrócitos durante o estado fisiológico e patológico.

A GFAP é a principal proteína do filamento intermediário de astrócitos maduros, portanto, contribui ativamente para a manutenção da estrutura desse tipo celular, além de participar da formação da cicatriz glial (SOFRONIEW; VINTERS, 2010; WANG; BORDEY, 2008). Alterações no imunoconteúdo dessa proteína acontecem em resposta tanto a estímulos fisiológicos quanto patológicos (ESCARTIN et al., 2021). Durante o exercício físico e a exposição a ambientes enriquecidos, o aumento no conteúdo de GFAP representa uma adaptação na plasticidade celular, e não uma sinalização danosa para o SNC (RODRÍGUEZ et

al., 2013). Porém, em condições patológicas, o aumento de GFAP pode ser interpretado como um sinal clássico de reatividade astrocitária, como é observado na patologia da DA, na qual o aumento da expressão de GFAP é observado especialmente próximo às placas de β -amiloide, característica marcante da doença (KAMPHUIS et al., 2014). Essa dualidade da resposta da GFAP a diferentes estímulos ressalta a importância do contexto para a avaliação da sua atividade frente ao SNC.

Além da GFAP, a proteína S100B também é um importante marcador de astrócitos. Apesar de não ser uma proteína exclusiva de astrócitos, a S100B, uma proteína ligante de cálcio, é sintetizada e secretada por astrócitos. A S100B possui um papel trófico intracelular, uma vez que age como um importante sinalizador de proliferação e migração celular. Uma vez secretada, também possui atividade fisiológica, aumentando o trofismo celular nos próprios astrócitos, e também outras células do SNC, como neurônios e microglia (DONATO et al., 2009). Mesmo possuindo efeitos benéficos, o aumento na concentração e secreção de S100B pode ser utilizado como marcador em doenças cerebrais, uma vez que níveis aumentados dessa proteína foram encontrados em pacientes em condições cerebrais patológicas, como a lesão cerebral traumática e a esclerose múltipla (BARATEIRO et al., 2016; GOYAL et al., 2013). Além disso, tanto a S100B quanto a GFAP são propostas como biomarcadores de estágios iniciais de DA, indicando que seu aumento pode sinalizar um dano mediado pelos astrócitos antes mesmo das manifestações clínicas mais comuns da doença (DELABY; HIRTZ; LEHMANN, 2023).

1.5.2. Funções

1.5.2.1. Metabolismo glutamatérgico

Dentre as diversas funções dos astrócitos no SNC, se destaca seu protagonismo no metabolismo glutamatérgico cerebral. O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC, é liberado por um neurônio pré-sináptico na fenda sináptica. O acúmulo de glutamato na fenda sináptica pode causar excitotoxicidade glutamatérgica, comprometendo a funcionalidade

da sinapse glutamatérgica. Para evitar esse acúmulo deletério de glutamato, os astrócitos captam glutamato através dos transportadores EAAT1/GLAST e EAAT2/GLT-1 (PARPURA et al., 2012). Essa atuação do astrócitos é tão importante que o termo sinapse tripartite é comumente empregado para descrever a cooperação entre o neurônio pré-sináptico, o neurônio pós-sináptico e o astrócito.

Uma vez no citoplasma dos astrócitos, o glutamato pode servir como substrato para a síntese de glutamina, através da ação da enzima glutamina sintetase (GS), outra proteína comumente adotada como marcadora de astrócitos. A GS sintetiza glutamina a partir de glutamato e amônia, portanto, sua ação também promove a detoxificação da amônia, que em níveis elevados pode ter efeitos centrais tóxicos (CHAN et al., 2016). Além disso, a glutamina sintetizada pela GS é devolvida aos neurônios, onde será novamente convertida em glutamato. Essa reciclagem de glutamato é conhecida como ciclo glutamato-glutamina.

1.5.2.2. Proteção antioxidante

Além da síntese de glutamina, o glutamato intracelular pode ter outros destinos nos astrócitos, como a síntese de GSH, um tripeptídeo composto pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato. A GSH é sintetizada majoritariamente nos astrócitos, e é responsável pela proteção antioxidante do SNC (BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009).

Sua síntese se inicia com a ligação do glutamato com a cisteína, através da enzima glutamato cisteína ligase (GCL), e é finalizada com a ligação do peptídeo formado com a glicina, reação catalisada pela enzima GSH sintetase. Além de sintetizar essa importante molécula antioxidante, os astrócitos realizam um efluxo de GSH para proteger o ambiente extracelular de danos oxidativos. Já no espaço extracelular, a GSH pode ser clivada, e a cisteína e glicina geradas dessa clivagem podem ser captadas e utilizadas pelo neurônio como substrato para a síntese de GSH (LU, 2013).

1.5.2.3. Resposta inflamatória

O protagonismo dos astrócitos não se restringe ao metabolismo glutamatérgico e proteção antioxidante. A resposta inflamatória, já caracterizada neste texto, é mediada tanto pela microglia quanto pelos astrócitos, que apesar de não serem classificados como células representantes do sistema imune, atuam modulando a resposta imunológica no SNC.

A imunocompetência dos astrócitos se inicia pela expressão de receptores toll-like, como por exemplo, o TLR4 (LI et al., 2021). Após o reconhecimento de um estímulo danoso, os astrócitos aumentam a produção de citocinas e quimiocinas através da translocação de NFκB, potencializando a resposta inflamatória e auxiliando na ativação do sistema imune adaptativo (COLOMBO; FARINA, 2016). A produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, IL-1β e TNF-α, bem como o aumento no conteúdo de GFAP, caracterizam um fenômeno conhecido como astrogliose ou reatividade astrocitária, presente em diversas condições patológicas que afetam o SNC (SOFRONIEW, 2014). Além das alterações funcionais, os astrócitos também medeiam o dano à BHE causado por insultos neuroinflamatórios, que levam ao aumento da permeabilidade da BHE, portanto, menor seletividade e maior susceptibilidade a exacerbação do dano (HEITHOFF et al., 2021).

1.6. Curcumina

Combater o dano inflamatório têm sido uma das abordagens terapêuticas em doenças que afetam o SNC, como as doenças neurodegenerativas. Em 2023, pelo menos 3 drogas em fase 3 de testes para o tratamento da DA têm como alvo a resposta imunológica e inflamatória (CUMMINGS et al., 2023). Na busca por moléculas candidatas a exercer um papel anti-inflamatório que poderiam agir tanto de uma forma protetora, ou seja, em conjunto com hábitos de vida saudáveis para reduzir riscos de saúde futuros, quanto como alvo da tecnologia farmacêutica para dar origem a novos medicamentos, se destaca a curcumina.

A curcumina é a principal molécula presente na *Curcuma longa*, também conhecida como açafrão da terra, pertencente à família das *Zingiberaceae*. Muito utilizada na medicina asiática e conhecida por sua forte coloração alaranjada, a Cúrcuma é composta de 1 a 6% por compostos bioativos chamados curcuminoides, como a própria curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina. A curcumina se destaca por compor a maior parte dentre os curcuminoides (cerca de 60%) além de ser a mais investigada por suas propriedades medicinais.

1.6.1. Estrutura

Também conhecida como diferuloilmetano, a curcumina é uma molécula simétrica (Figura 1), contendo dois característicos anéis aromáticos metoxifenóis, unidos por um ligante de sete carbonos consistindo em uma fração β -dicetona α,β insaturada. Sua estrutura pode variar conforme o pH do ambiente, alternando de uma forma enólica em pH alcalino (≥ 8) para a forma cetônica em pH neutro e ácido. A curcumina possui baixa solubilidade em água, e alta solubilidade em dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, etanol e acetona (PRIYADARSINI, 2014).

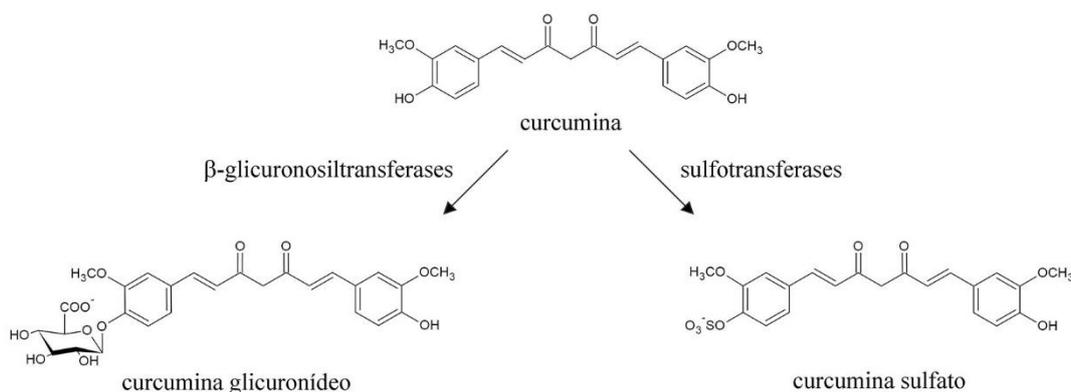


Figura 1. Estrutura da curcumina e degradação intestinal.

Apesar de ter uma estabilidade relativamente alta, a curcumina é susceptível a degradação pela exposição à luz solar ou em meio alcalino, onde muda sua coloração característica alaranjada para cor vinho.

1.6.2. Biodisponibilidade

Após ingerida, a curcumina passa por diversos processos de degradação que resultam em uma redução significativa de sua biodisponibilidade. No intestino, ela sofre glicuronidação e sulfatação, processos realizados por enzimas β -glicuronidases e sulfatases (Figura 1). Em 1978, Wahlstrom e Blennow constataram que, em ratos, quando administrada na dose de 1 g/Kg de peso corporal, cerca de 75% da curcumina administrada era encontrada nas fezes dos animais, indicando uma baixa absorção intestinal (WAHLSTRÖM; BLENNOW, 1978). Na mesma concentração, após absorvida, a curcumina chega à circulação, atingindo sua concentração máxima no plasma cerca de 1 hora após administração via oral, conforme demonstrado por Pan e colaboradores. Seis horas após a administração, a curcumina não foi mais detectada na circulação (PAN; HUANG; LIN, 1999).

Além do extenso metabolismo intestinal, a curcumina também sofre modificações, conforme descrito por Hoehle e colaboradores, que detectaram a formação de metabólitos reduzidos da curcumina no tecido hepático de ratos (HOEHLE et al., 2006).

Para superar o desafio da baixa biodisponibilidade, diversas estratégias têm sido exploradas, como a administração concomitante a refeições ricas em gordura e a caracterização de protocolos com jejum pré-administração (BEGUM et al., 2008). Além disso, o desenvolvimento de nanoformulações, micelas e bioconjugados, bem como a administração com adjuvantes como a piperina, se destacam como maneiras eficientes de melhorar a biodisponibilidade da curcumina (ASKARIZADEH et al., 2020).

1.6.3. Passagem pela barreira hematoencefálica

Apesar da baixa biodisponibilidade ser o principal desafio para o uso terapêutico da curcumina, registros de sua passagem pela BHE já foram descritos na literatura. A BHE é uma estrutura semi-permeável, formada por células endoteliais, astrócitos e pericitos, cuja função é proteger o SNC de moléculas que possam causar dano aos circuitos cerebrais. A seletividade da BHE impede que compostos grandes, especialmente hidrofílicos, de adentrarem ao parênquima cerebral. Moléculas hidrofóbicas com peso inferior a 500 Da podem ser transportadas para o cérebro através de transcitose passiva pelas junções de oclusão das células endoteliais (WU et al., 2023).

A curcumina possui estrutura hidrofóbica, e peso molecular de 368,38 Da, ou seja, sua estrutura química a possibilita passar pela BHE. Apesar de o exato mecanismo que medeia a passagem da curcumina pela BHE ainda não ser consenso na literatura, Begum e colaboradores detectaram curcumina no tecido cerebral 4 horas após administração via gavagem, enquanto Sorrenti e colaboradores detectaram curcumina no tecido cerebral 3 horas após a gavagem (BEGUM et al., 2008; SORRENTI et al., 2018). Já Tsai e colaboradores detectaram curcumina no tecido cerebral apenas 15 minutos após administração via intravenosa. Além da detecção no tecido cerebral, há evidências de que a curcumina pode se acumular no hipocampo (TSAI et al., 2011).

1.6.4. Atividade antioxidante

A passagem da curcumina pela BHE abre novas perspectivas na utilização de suas propriedades para beneficiar as células do SNC. Dentre as propriedades da curcumina, uma das mais bem descritas é a sua ação antioxidante.

Condições patológicas que afetam o SNC causam um aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio, seja pelo estresse traumático que leva à ruptura da membrana celular, ou pela regulação das defesas antioxidantes. O fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2

(NRF2) é um fator de transcrição, cuja sinalização induz a expressão e a atividade de moléculas antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, e a síntese de moléculas antioxidantes não-enzimáticas, como a GSH (MA, 2013). Em doenças neurodegenerativas, a redução da sinalização da via do NRF2 tem sido reportada como um importante fator na progressão da doença (SANDBERG et al., 2014). Dessa forma, além de um aumento na produção de espécies reativas, ainda há uma redução na proteção antioxidante, tornando o SNC ainda mais vulnerável ao dano oxidativo.

A curcumina possui atividade *scavenger*, ou seja, é capaz de estabilizar espécies reativas e proteger as membranas celulares da peroxidação lipídica. Além disso, a curcumina também é capaz de aumentar a expressão gênica de enzimas antioxidantes, bem como aumentar o conteúdo de GSH, a molécula mais importante na proteção antioxidante do SNC (PULIDO-MORAN et al., 2016). Em cultura celular de astrócitos, a curcumina foi capaz de aumentar o conteúdo de GSH, bem como a expressão gênica de subunidades enzimáticas envolvidas na síntese de GSH, como a subunidade catalítica da GCL, subunidade reguladora da GCL, além da expressão gênica de glutathione sintetase. A atividade da enzima GCL também foi aumentada na presença de curcumina, em condições basais (LAVOIE et al., 2009). Um dos mecanismos pelo qual a curcumina exerce ação antioxidante é através do estímulo da via do NRF2 (ASHRAFIZADEH et al., 2020).

1.6.5. Atividade anti-inflamatória

Além da atividade antioxidante, a ação anti-inflamatória da curcumina é amplamente investigada na literatura científica. Sua capacidade anti-inflamatória é exercida através da diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, resultado da inibição da translocação de NF κ B para o núcleo, conforme demonstrado em diversos modelos celulares (ABDOLLAHI et al., 2018). A curcumina é capaz de inibir a ativação da enzima I κ B cinase- α , resultando na

incapacidade da liberação do NFκB pelo IκB, portanto, inibindo sua ativação (PENG et al., 2021). Além disso, por ser uma molécula pleiotrópica, a curcumina também age por outros mecanismos, tal qual a ligação aos TLRs, porém, diferentemente da resposta causada pelos PAMPs e DAMPs, o efeito exercido pela curcumina sob os TLRs é inibitório (BOOZARI; BUTLER; SAHEBKAR, 2019).

Conforme descrito anteriormente neste trabalho, o LPS se liga ao receptor TLR4, causando uma cascata sinalizadora que resulta na resposta inflamatória. Para que a cascata seja corretamente estimulada, o LPS causa uma dimerização do receptor TLR4, resultando em uma dupla via de sinalização: uma através da proteína MyD88, e outra através da proteína TRIF (BOOZARI; BUTLER; SAHEBKAR, 2019). A curcumina é capaz de inibir ambas as sinalizações, conforme observado em células Ba/F3, nas quais a curcumina inibiu a translocação de NFκB e a ativação do fator regulador do interferon 3 causadas pelo LPS (YOUN et al., 2006). A translocação de NFκB é conhecida como o principal efetor da ação da via MyD88-dependente, enquanto a ativação do fator regulador do interferon 3 é característica da via TRIF-dependente.

Além da ação ativa na redução da sinalização inflamatória, ensaios de *docking molecular* indicam que a curcumina é capaz de se ligar à proteína MD-2. A proteína MD-2 é essencial para o reconhecimento do LPS pelo TLR4, portanto, a curcumina poderia inibir a sinalização via TLR4 por reduzir a ligação do LPS no seu receptor (GRADIŠAR et al., 2007).

Ambas as ações antioxidantes e anti-inflamatórias da curcumina derivam de múltiplas interações com vias bioquímicas, portanto, a coloca como forte candidata no desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras, especialmente no que diz respeito à neuroinflamação.

1.7. Piperina

O potencial neuroprotetor da curcumina reforçou a necessidade da busca pela melhora de sua biodisponibilidade. Uma alternativa simples, barata e efetiva é a administração de curcumina concomitante a piperina.

A piperina é um alcaloide, presente na pimenta preta (*Piper Nigrum*). Interessantemente, a piperina, juntamente com a curcumina, faz parte da composição de um tempero popular na culinária mundial, conhecido como *curry*. Além de atribuir sabor aos alimentos, a piperina também inibe a glicuronidação intestinal, processo sofrido pela curcumina após sua ingestão via oral (SHOBA et al., 1998). A melhora da absorção da curcumina através da ingestão concomitante com piperina já foi descrita na literatura, após testada em modelos animais e em seres humanos (ANAND et al., 2007; JANGRA et al., 2016).

Apesar de o objetivo principal da administração conjunta de curcumina e piperina ser a melhora na biodisponibilidade da curcumina, foi observado que, em estudos *in vitro*, a piperina é capaz de agir de forma sinérgica com a curcumina (ERFEN; AKBAY ÇETIN, 2022; MARTINS et al., 2015). Assim como a curcumina, a piperina também possui efeito antioxidante e anti-inflamatório, e o tratamento concomitante com a curcumina pode resultar em uma melhora na solubilidade, facilidade na captação pela célula e diminuição da velocidade do processo metabólico da curcumina (DUBEY et al., 2008).

2. Justificativa

Apesar da importância dos astrócitos na manutenção do SNC, bem como da resposta inflamatória, e o potencial efeito neuroprotetor da curcumina, poucos estudos têm sido realizados sobre seus efeitos e mecanismos de ação em parâmetros de funções astrocíticas, principalmente no que diz respeito à neuroinflamação. Além disso, embora haja investigação dos efeitos da curcumina em modelos de inflamação induzidos por injeção de LPS intraperitoneal, poucos estudos exploram os efeitos da curcumina via oral em um modelo de

neuroinflamação com origem no SNC. Tendo em vista que a neuroinflamação é um processo presente em diversas doenças que afetam o funcionamento cerebral, faz-se necessário investigar o papel da curcumina em um processo de inflamação central, bem como caracterizar seus alvos moleculares e possível sinergismo com a piperina, com foco nos astrócitos.

2.1. Objetivo geral

Avaliar os mecanismos de ação da curcumina *in vitro*, bem como seus efeitos em modelo de neuroinflamação *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Avaliar os efeitos e mecanismos da curcumina e piperina em cultura primária de astrócitos sobre proteínas marcadoras (conteúdo de GFAP, secreção e conteúdo de S100B) e metabolismo glutamatérgico (captação de glutamato, atividade da GS, conteúdo de GSH) em condições basais. Investigar os efeitos isolados ou combinados de curcumina e piperina em um modelo de neuroinflamação *in vitro* induzido por LPS, através da avaliação da secreção de TNF- α , conteúdo de GFAP, secreção e conteúdo de S100B.
- 2.2.2. Avaliar o efeito da administração oral de curcumina em modelo de neuroinflamação originada no SNC através de testes comportamentais (teste de campo aberto, teste de preferência por sacarose) e análises bioquímicas (conteúdo de IL-1 β , IL-6, imunocónteuó de COX-2 e Iba-1, secreção e conteúdo de S100B, conteúdo de GFAP, captação de glutamato, atividade da GS e conteúdo de GSH).

3. Resultados

3.1. Capítulo I

Curcumin modulates astrocyte function under basal and inflammatory conditions.

Artigo publicado no periódico *Brain Research* (versão publicada pode ser acessada através do link <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148519>)

3.2. Capítulo II

Curcumin attenuates neuroinflammatory damage induced by lipopolysaccharide.

Artigo a ser submetido no periódico *The Journal of Nutritional Biochemistry*.

4. Discussão

4.1. Curcumina modula funções astrocíticas em condições basais e inflamatórias

4.1.1. Efeito da curcumina e piperina em astrócitos em condições basais

Nossos resultados trazem uma ampla caracterização do efeito da curcumina e piperina, em diferentes concentrações, em funções astrocíticas. A fim de analisar os efeitos de ambos os compostos na funcionalidade celular, iniciamos os experimentos pelos ensaios de viabilidade e integridade celular, para que concentrações que exercessem efeitos tóxicos nas células fossem descartadas para as análises posteriores. As concentrações de curcumina foram escolhidas com base na literatura, levando em considerações linhagens ou culturas primárias de células do SNC (ASHRAFIZADEH et al., 2020; BERNARDO et al., 2021; ERFEN; AKBAY ÇETIN, 2022; LAVOIE et al., 2009; YU et al., 2016; ZHANG et al., 2019). As concentrações de piperina também foram escolhidas com base na literatura, porém, levando em consideração culturas de outros tipos celulares além das células do SNC, devido ao escasso número de artigos investigando o efeito da piperina em células neurais e gliais (ERFEN; AKBAY ÇETIN, 2022; LI et al., 2015).

A curcumina, na concentração de 100 μM , foi tóxica para as culturas, conforme demonstrado pelas técnicas de redução de MTT, incorporação de vermelho neutro e atividade da lactato desidrogenase extracelular (LDH). Apesar de, em células de linhagem celular de astrócitos, concentrações acima de 10 μM demonstrarem toxicidade, nosso resultado corrobora resultados prévios em culturas primárias de astrócitos, que demonstram toxicidade apenas em concentrações acima de 50 μM , incluindo a dose de 100 μM (ERFEN; AKBAY ÇETIN, 2022; LAVOIE et al., 2009). Por esse motivo, decidimos excluir a concentração de 100 μM das análises posteriores. A concentração de 75 μM de curcumina não alterou a incorporação de vermelho neutro, nem a redução de MTT, porém, causou um aumento da atividade da LDH

extracelular, indicando que existe um comprometimento da integridade celular, visto que essa enzima, em condições fisiológicas, atua majoritariamente de forma intracelular.

A piperina não demonstrou efeitos tóxicos até 100 μM , o que corrobora com resultados em *in vitro* que não encontraram toxicidade em concentrações abaixo de 500 μM (LI et al., 2015). Em culturas primárias de astrócitos, a piperina só demonstrou toxicidade depois de 48 horas de tratamento, diferente dos tratamentos descritos neste estudo, que foram realizados em 24 horas (ERFEN; AKBAY ÇETIN, 2022).

Para seguir caracterizando os efeitos da curcumina e piperina em culturas celulares de astrócitos, escolhemos manter as concentrações de 10, 25, 50 e 75 μM para ambos os compostos.

A morfologia celular foi avaliada através da marcação da proteína de citoesqueleto actina. Até a concentração de 50 μM de curcumina, a marcação de actina seguiu o padrão de células controle, com o citoesqueleto bem preservado, característico de uma célula saudável. O tratamento com curcumina na concentração de 75 μM resultou em uma despolimerização da actina com perda das fibras de estresse, indicando um dano na morfologia celular, característico de compostos que causam dano ao funcionamento celular, como o LPS (FORSHAMMAR et al., 2011).

Para avaliar se a curcumina e a piperina teriam efeito sobre o metabolismo glutamatérgico de astrócitos em condições basais, realizamos a captação de glutamato e observamos uma redução neste parâmetro na concentração de 75 μM de curcumina. Este resultado é mais um indicador de toxicidade desta concentração, visto que, embora nossos resultados se refiram apenas a astrócitos, a redução na captação de glutamato pode resultar em um acúmulo do glutamato na fenda sináptica na presença de neurônios e astrócitos, e esse acúmulo pode ativar de forma exacerbada os receptores glutamatérgicos no neurônio pós-sináptico, causando

toxicidade (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Além disso, o excesso de glutamato na fenda sináptica pode reduzir a captação de cisteína pelo neurônio, aminoácido essencial para a síntese de GSH, uma molécula antioxidante essencial para a proteção do SNC (WANG et al., 2020).

Apesar de a captação de glutamato não ter sido aumentada em nenhuma das concentrações testadas, o conteúdo de GSH foi aumentado após o tratamento com curcumina na concentração de 50 μM . Mesmo sem um aumento da captação de glutamato do meio extracelular, a fonte intracelular de glutamato para o aumento de GSH pode ser o α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs. Nosso resultado está de acordo com dados na literatura que mostraram um aumento no conteúdo de GSH, nessa mesma concentração, em astrócitos (LAVOIE et al., 2009). Além disso, estudos indicam que o tratamento com 30 μM aumenta o efluxo de GSH para o meio extracelular (STRIDH et al., 2010). O aumento da GSH causado pela curcumina indica uma melhora na proteção antioxidante celular, visto que teores elevados de GSH em condições basais poderiam trazer proteção adicional ao SNC perante a situações patológicas com componente oxidativo, como na DA e na doença de Parkinson (ABORODE et al., 2022).

Interessantemente, a partir da concentração de 50 μM de curcumina, houve um aumento no conteúdo de GFAP. Apesar de o aumento no conteúdo de GFAP ser conhecido como um marcador de reatividade, Escartin e colaboradores trouxeram uma importante análise que alerta em relação a simplificação do conceito de astrócitos reativos, bem como da utilização da GFAP como marcador de um processo patológico (ESCARTIN et al., 2021). O aumento de GFAP também ocorre em resposta a estímulos benéficos, como o exercício físico e a exposição a ambientes enriquecidos (RODRÍGUEZ et al., 2013). Nesse contexto, a alteração no conteúdo desta proteína indica um aumento na plasticidade e trofismo celular, fatores importantes para adaptações fisiológicas celulares, ou seja, não se refere a um processo patológico. Por isso, Escartin e colaboradores sugerem que, para avaliar fenótipos astrocíticos, devem ser analisados

múltiplos marcadores, ao invés de apenas a marcação/dosagem de GFAP (ESCARTIN et al., 2021). Em nossos resultados, a concentração de 50 μM de curcumina não demonstrou toxicidade em nenhum dos ensaios de viabilidade e integridade celular, além de manter a morfologia celular preservada e aumentar a proteção antioxidante, através do conteúdo de GSH. Por esse motivo, não acreditamos que o aumento de GFAP na concentração de 50 μM represente um processo patológico celular, e sim um processo de estímulo fisiológico, compatível com adaptações positivas para o funcionamento celular.

As concentrações de 50 e 75 μM também causaram uma alteração na secreção de S100B em condições basais, apesar de não alterarem seu conteúdo intracelular. Alterações na secreção de S100B nem sempre se relacionam com sua concentração intracelular, devido à alta concentração de S100B intracelular em astrócitos (GONÇALVES; CONCLI LEITE; NARDIN, 2008). A redução na secreção de S100B, da mesma forma que o aumento no conteúdo de GSH, pode representar uma adaptação preventiva das células, visto que, em situações patológicas, o aumento exacerbado na secreção de S100B pode contribuir com a progressão do processo inflamatório (MICHETTI et al., 2019).

Os efeitos da curcumina em condições basais trouxeram destaque para duas concentrações: 50 e 75 μM . A concentração de 75 μM por, apesar de não ter alterado a redução de MTT e a incorporação de VN, dá indícios de toxicidade através do aumento da atividade extracelular de LDH, alteração na morfologia celular e redução da captação de glutamato. Já a concentração de 50 μM de curcumina chama a atenção por aumentar o conteúdo de GSH, GFAP e reduzir a secreção de S100B, sem indicar toxicidade pelos ensaios de viabilidade, integridade e morfologia celular.

4.1.2. Efeito da curcumina e piperina isoladas ou em combinação sob a sinalização inflamatória causada por lipopolissacarídeo

Interessantemente, os efeitos da curcumina, um composto anti-inflamatório, no que diz respeito às proteínas GFAP e S100B, é similar aos efeitos do LPS, um composto pró-inflamatório, em culturas primárias de astrócitos, conforme descrito por estudos prévios de nosso grupo (GUERRA et al., 2011). Por esse motivo, decidimos testar a curcumina e piperina isoladas e combinadas em culturas de astrócitos em condições inflamatórias, provocada pelo LPS. A concentração de curcumina escolhida foi a de 50 μ M, devido a sua capacidade de provocar alterações no funcionamento e sinalização dos astrócitos, sem causar toxicidade. Apesar de a piperina não demonstrar efeitos em astrócitos em condições basais, acreditamos que, frente a um estímulo inflamatório, ou em combinação com a curcumina, os efeitos poderiam ser observados. Portanto, escolhemos a concentração de 50 μ M de piperina para os experimentos posteriores. Nenhum dos tratamentos causou alterações de viabilidade e integridade celular nessa segunda fase de experimentos.

A fim de avaliar a resposta inflamatória causada pelo LPS, realizamos a dosagem de TNF- α , uma importante citocina pró-inflamatória, no meio extracelular de culturas de astrócito. O LPS foi capaz de aumentar a secreção de TNF- α , efeito que corrobora resultados prévios de nosso grupo (GUERRA et al., 2011). Tanto a curcumina quanto a piperina foram capazes de reverter a níveis basais a sinalização inflamatória causada pelo LPS, no que diz respeito à secreção de TNF- α . Em estudos *in vitro*, a curcumina já tinha sido demonstrada como uma molécula capaz de reduzir a sinalização do TNF- α , conforme observado em culturas de astrócitos, micróglia e neurônios (JIN et al., 2007; SEYEDZADEH et al., 2014; YU et al., 2016). A ação anti-inflamatória da piperina, apesar de não ter sido descrita em culturas de astrócitos até esse momento, já foi observada em linhagens de microglia (WANG-SHENG et al., 2017). É importante mencionar que, apesar de ambos os compostos exercerem atividade anti-inflamatória em astrócitos, não foi observado efeito sinérgico ou cumulativo.

No que diz respeito ao efeito do LPS, curcumina e piperina na secreção de S100B, observamos, conforme esperado, uma redução na secreção de S100B causada pelo LPS após 24 horas de tratamento. O efeito do LPS sobre as culturas de astrócito parece ter um efeito dual: em 1 hora, o LPS causa um aumento na secreção de S100B; em 24 horas, as concentrações extracelulares são diminuídas em comparação ao basal. O efeito do LPS na secreção de S100B em 24 horas é mediado pela ação do TLR4, conforme observado por estudos prévios de nosso grupo (GUERRA et al., 2011).

A curcumina, em condições inflamatórias provocadas pelo LPS, causou uma redução ainda mais significativa de S100B, reforçando seu efeito modulador nessa proteína. Esse efeito parece acontecer através de outro mecanismo, visto que o efeito do LPS e da curcumina na secreção de S100B é cumulativo. Nós acreditamos que esse efeito pode ter relação com a redução do conteúdo intracelular de AMPc, que já é conhecido como um fator que causa redução na secreção de S100B (LABOURDETTE; MANDEL, 1980; PINTO et al., 2000). Recentemente, foram reconhecidos novos receptores acoplados a proteína G como alvos moleculares da curcumina (HARADA et al., 2022a, 2022b). Esses dados indicam a possibilidade de existirem receptores acoplados à proteína G inibitória em astrócitos, de modo que a curcumina, ao se ligar a esses receptores, causaria uma redução no AMPc intracelular, portanto, uma redução na secreção de S100B.

Uma perspectiva futura importante para confirmar essa informação seria a análise por *docking molecular* de receptores acoplados a proteína G nos astrócitos que fossem compatíveis com a curcumina, além de uma posterior inibição desse receptor para investigar se os efeitos da curcumina seriam mantidos, ou anulados.

O efeito do LPS sobre as culturas de astrócitos também causou um aumento no conteúdo de GFAP. Em uma análise que prioriza o contexto, acreditamos que esse aumento tenha relação

com a intensa resposta inflamatória observada através do aumento na secreção de TNF- α . Em condições inflamatórias provocadas pelo LPS, a curcumina não demonstrou ter efeito cumulativo, da mesma forma que não reverteu o aumento de GFAP causado pelo LPS. Já a piperina, que não induziu alterações em astrócitos em condições basais, foi capaz de reverter o aumento de GFAP, possivelmente através da reversão da sinalização inflamatória. Esse resultado, apesar de novamente não indicar efeito sinérgico entre a curcumina e a piperina, indica que ambas possam ter um efeito complementar. Na medida que a curcumina é capaz de modular a proteína S100B, a piperina é capaz de modular a GFAP, e ambas reduzem a sinalização inflamatória em astrócitos. Mais estudos são necessários para contextualizar os efeitos moduladores da curcumina e piperina nessas proteínas em um modelo de neuroinflamação *in vivo*.

4.2. Curcumina atenua o dano neuroinflamatório induzido por uma injeção intracerebroventricular de lipopolissacarídeo

4.2.1. Curcumina atinge o sistema nervoso central após administração via gavagem

Após constatada a atividade anti-inflamatória da curcumina em culturas de astrócitos no primeiro capítulo deste trabalho, algumas importantes questões foram levantadas. Uma delas foi se a curcumina, levando em consideração a sua baixa biodisponibilidade oral, conseguiria ter efeitos similares aos efeitos observados *in vitro*, agora em um modelo de neuroinflamação *in vivo*.

Para averiguar se a curcumina de fato estava chegando ao SNC, dosamos a curcumina no tecido hipocampal de ratos 1 e 24 horas após a administração via oral. O tecido hipocampal foi escolhido para a dosagem de curcumina, visto que dados anteriores da literatura sugerem que a curcumina se acumula no hipocampo (TSAI et al., 2011). Além disso, o hipocampo já foi descrito como a estrutura mais vulnerável em modelos de sepse (SEMMLER et al., 2005). Por

mais que nosso modelo não tenha doses de LPS elevadas o suficiente para causar sepse, o dano inflamatório ainda é extenso, portanto, avaliar o hipocampo pode trazer mais respostas do que avaliar outras estruturas que também estão envolvidas nesse modelo.

Nosso resultado de dosagem de curcumina não só corrobora dados da literatura, que demonstram que a curcumina sozinha é capaz de atravessar a BHE, como adiciona novas informações. Estudos prévios detectaram a curcumina no cérebro 3 e 4 horas após administração oral, enquanto nossos dados demonstram que a curcumina chega ao hipocampo em apenas 1 hora após a administração, e permanece nesse tecido até 24 horas depois (BEGUM et al., 2008; SORRENTI et al., 2018). É importante ressaltar que a detecção de curcumina no cérebro de animais só tinha sido realizada em tempos abaixo de 1 hora em modelos de administração intravenosa (TSAI et al., 2011).

4.2.2. Efeitos protetores da curcumina 24 e 48 horas após a administração central de LPS

Após a definição de que a curcumina de fato chega ao tecido cerebral, observamos o comportamento dos animais frente a um estímulo inflamatório agudo, com e sem o pré-tratamento com curcumina via oral.

Os animais que não receberam a curcumina demonstraram sinais clássicos de comportamento doente, do inglês *sickness behavior*, que inclui perda de peso acentuada, anedonia e letargia. Esses sintomas representam uma organização do sistema imune e metabólico orquestrada pelas citocinas pró-inflamatórias, para que o combate ao patógeno ou molécula causadora do dano seja priorizado (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002).

Vinte e quatro horas após a injeção ICV de LPS, os animais perderam mais peso em comparação ao grupo sham, dado que corrobora estudos anteriores do nosso grupo (DA RÉ et al., 2020). Além disso, a ingestão hídrica total foi reduzida nos grupos que receberam LPS,

indicando uma piora no bem-estar geral. Por fim, avaliamos a anedonia através do teste de preferência por sacarose, bem como o comportamento locomotor através do teste de campo aberto. Ambos os comportamentos avaliados foram fortemente afetados pela administração de LPS, que causou uma redução da preferência por sacarose e uma redução na distância percorrida e velocidade média dos animais, 24 horas após a cirurgia estereotáxica.

A curcumina não foi capaz de prevenir a perda de peso, a redução na ingestão hídrica total e a anedonia causada pelo LPS. Esses resultados podem ser decorrentes de uma distribuição irregular de curcumina pelo SNC, visto que, apesar de nossa dosagem de curcumina ter sido no hipocampo, outras estruturas, como o hipotálamo, amígdala e estriado estão envolvidas no controle alimentar e são também afetadas pela administração de LPS (LI et al., 2021). Em modelos animais com administração intraperitoneal (IP) de LPS, o pré-tratamento com curcumina foi capaz de reduzir a perda de peso, o que também levanta dúvidas sobre a extensão da resposta inflamatória causada pelo modelo de administração IP x ICV de LPS. O dano ICV pode ser mais extenso, a ponto de dificultar a ação da curcumina na proteção de alguns aspectos do comportamento doente. Além disso, o efeito protetor da curcumina via oral em modelos de administração sistêmica de LPS pode acontecer na periferia, portanto, devemos questionar a validade destes modelos para estudar danos originados no SNC. Estudos avaliando a distribuição de curcumina em diferentes estruturas após administração via oral, bem como estudos caracterizando o dano inflamatório no modelo de LPS ICV para comparar com o dano inflamatório no modelo de LPS intraperitoneal se fazem necessários para confirmar estas hipóteses.

Com relação ao comportamento locomotor, a curcumina foi capaz de atenuar o dano causado pelo LPS na distância percorrida, e reverter totalmente o dano observado na velocidade percorrida 24 horas após a cirurgia estereotáxica. Esses resultados corroboram dados da

literatura que utilizam modelos de administração IP de LPS (JANGRA et al., 2016; SORRENTI et al., 2018), e confirmam que a anedonia constatada pela redução da preferência por sacarose não tem relação com a locomoção dos animais, visto que os animais do grupo curcumina tiveram uma melhora significativa na locomoção, e ainda assim não buscaram a solução açucarada da mesma forma que os animais do grupo Sham.

Quarenta e oito horas após a administração de LPS, a perda de peso e o dano ao comportamento locomotor seguem presentes nos grupos que receberam LPS. Novamente, a curcumina foi capaz de reverter totalmente a redução da distância percorrida e velocidade média causadas pelo LPS, porém, não foi capaz de atenuar a perda de peso causada por esse modelo. O consumo hídrico e a anedonia já foram reestabelecidos, demonstrando uma recuperação pós-LPS. Interessantemente, o grupo que recebeu curcumina ainda não reestabeleceu a preferência por sacarose, enquanto o grupo LPS já recuperou o prazer em consumir a solução açucarada, comportamento esperado pela palatabilidade superior da solução de sacarose em comparação à água, e observado nos animais antes da indução do dano inflamatório.

4.2.3. Caracterização bioquímica do dano inflamatório causado por lipopolissacarídeo, bem como efeitos protetores da curcumina 72 horas após a administração central de LPS

Após a avaliação do comportamento doente dos animais, analisamos parâmetros bioquímicos 72 horas após a cirurgia estereotáxica. Constatamos que a sinalização inflamatória estava presente no tecido cerebral, através do aumento no conteúdo de IL1 β , IL-6, COX-2 e Iba-1. Dados anteriores de nosso grupo já haviam detectado o aumento na concentração de IL1 β e COX-2 48 horas após a administração ICV de LPS, mas nossos dados demonstram que a sinalização inflamatória segue ativa, mesmo 72 horas pós-cirurgia (DA RÉ et al., 2020). Tyagi e colaboradores também observaram um aumento na concentração de IL1 β 48 horas após a cirurgia estereotáxica, mas observaram que 96 horas depois da administração de LPS, tanto esta

citocina pró-inflamatória quanto o TNF- α , já tinham retornado aos valores de animais controle. É importante citar que os animais já demonstravam uma melhora no bem-estar geral, com perda de peso menos intensa e melhora no consumo hídrico e anedonia, porém, a sinalização inflamatória ainda estava ativa no grupo LPS.

A curcumina foi capaz de reverter o aumento de IL1 β e COX-2 causados pelo LPS, e atenuar o aumento do imunoconteúdo de Iba-1. Esses resultados corroboram dados da literatura que indicam o efeito anti-inflamatório da curcumina em animais após administração de LPS IP (JANGRA et al., 2016; SORRENTI et al., 2018). Além disso, o tratamento com curcumina em células BV2 é capaz de reduzir a sinalização inflamatória causada pelo LPS, através da ação inibitória da curcumina na via iniciada pela ligação do LPS com o TLR4, passando pela translocação de NF κ B e resultando na secreção de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG et al., 2019).

Além da possível ação da curcumina na via do TLR4/NF κ B, outro mecanismo envolvido na ação anti-inflamatória da curcumina é mediado pela ligação da curcumina com o receptor PPAR- γ . Em oligodendrócitos, o tratamento com curcumina foi capaz de reverter a sinalização inflamatória causada por TNF- α , porém, o bloqueio do PPAR- γ pelo antagonista GW9662 anulou os efeitos protetores da curcumina (BERNARDO et al., 2021). Esses resultados reforçam a ação pleiotrópica da curcumina, ou seja, a ação anti-inflamatória não resulta de apenas uma interação, e sim de interações com alvos moleculares diversos.

Proteínas marcadoras de astrócitos também foram investigadas, visto que os astrócitos, juntamente com a microglia, atuam de forma ativa na resposta inflamatória no SNC. A secreção de S100B foi avaliada através da dosagem no LCR 72 horas após a administração de LPS. O grupo LPS causou um aumento na secreção de S100B, que foi revertido pela curcumina. Artigos anteriores do nosso grupo de pesquisa já haviam detectado um aumento de S100B 30 minutos

e 24 horas após a administração ICV de LPS, porém, nosso trabalho mostra que a secreção dessa importante proteína astrocítica segue aumentada mesmo 72 horas após a cirurgia (GUERRA et al., 2011). Apesar de a concentração intracelular de S100B nem sempre refletir as alterações no padrão de secreção, em nosso estudo, o conteúdo intracelular de S100B estava reduzido no grupo LPS, e aumentado no grupo LPS + curcumina. A ação da curcumina em reduzir a secreção de S100B foi vista pelo nosso grupo e discutida nesta tese. Esse resultado *in vivo* está de acordo com o resultado observado em culturas de astrócitos, reforçando a importância de estudar os mecanismos por trás dessa ação inibitória importante da curcumina na secreção de S100B. Visto que a secreção de S100B tem sido usada como marcadora de prognóstico em condições que afetam o SNC, como esclerose múltipla e traumatismo cranioencefálico, a curcumina passa a ser uma candidata para terapias que utilizam S100B como alvo molecular, na tentativa de controlar a exacerbação do dano ao SNC (BARATEIRO et al., 2016; MICHETTI et al., 2019).

Apesar de, neste mesmo modelo de administração aguda de LPS, nosso grupo ter publicado dados mostrando um aumento no conteúdo de GFAP 48 horas após a cirurgia estereotáxica, não encontramos essa alteração 72 horas após a cirurgia (DA RÉ et al., 2020). Acreditamos que, uma vez que os animais já demonstram sinais de recuperação nesse tempo pós-cirúrgico, alguns marcadores, como a GFAP, já tenham retornado a valores basais.

Por fim, para seguir investigando o papel dos astrócitos no dano inflamatório causado pelo LPS, investigamos alterações no metabolismo glutamatérgico 72 horas após a cirurgia estereotáxica. Não encontramos alterações na captação de glutamato ou atividade da GS, porém, o conteúdo de GSH estava reduzido de forma importante no grupo LPS. Essa redução foi revertida pela administração oral de curcumina, indicando uma importante ação antioxidante deste composto. O aumento de GSH em astrócitos em condições basais já tinha sido observado

em outro trabalho desta mesma tese, porém, nesse segundo trabalho, confirmamos que essa resposta também acontece em condições inflamatórias, ou seja: o aumento da GSH em condições basais provavelmente protege o grupo que recebeu curcumina do dano oxidativo. Nosso resultado corrobora estudos da literatura que indicam que a administração ICV de LPS causa uma redução no conteúdo de GSH até 96 horas após a cirurgia estereotáxica (TYAGI et al., 2008), e adiciona a informação de que a curcumina é capaz de reverter este parâmetro e modular funções outras funções astrocíticas, como a secreção de S100B.

5. Considerações finais

Nossos resultados elucidam mecanismos e trazem novas informações em relação à ação da curcumina, principalmente no que diz respeito aos astrócitos.

O trabalho em culturas de astrócitos foi capaz de demonstrar a ação antioxidante da curcumina, através do aumento do conteúdo de GSH, a atividade regulatória da curcumina em proteínas astrocíticas, através da redução da secreção de S100B e aumento no conteúdo de GFAP em condições basais. A capacidade da curcumina em modular S100B e GFAP não havia sido descrita em culturas de astrócitos. Já em condições inflamatórias, a curcumina seguiu modulando de forma importante a secreção de S100B e reverteu a secreção de TNF- α provocada por LPS, confirmando seu efeito anti-inflamatório neste tipo celular.

Os resultados da curcumina *in vitro*, especialmente em condições basais, nos permitem discutir que a avaliação da proteína GFAP isoladamente como marcadora de reatividade astrocítica pode levar a simplificações incorretas, visto que a mesma concentração de curcumina que aumentou GFAP, também aumentou GSH e reduziu a secreção de TNF- α . Portanto, pela avaliação do contexto, a curcumina foi protetora para os astrócitos em condições basais e inflamatórias.

A piperina, composto sugerido como amplificador da biodisponibilidade da curcumina ou sinérgico, não potencializou os efeitos da curcumina, mas os complementou. A piperina foi capaz de reduzir o conteúdo de GFAP que havia sido aumentado pelo LPS (que também aumentou a secreção de TNF- α), ação protetora que não foi observada no tratamento com curcumina. Portanto, em nossas culturas de astrócitos em condições inflamatórias, a ação de ambos os compostos foi complementar: a curcumina modulou a S100B, a piperina modulou a GFAP e ambas reduziram a secreção do TNF- α .

Nossos resultados não descartam que exista uma ação sinérgica dos dois compostos, porém, não podemos afirmar que houve sinergismo pelo que foi observado neste trabalho. Outros parâmetros astrocíticos, como a GSH, em outros contextos, como em danos oxidativos, devem ser avaliados para elucidar melhor o efeito cumulativo dos dois compostos.

Os resultados da curcumina *in vitro* abrem espaço para diversos questionamentos em relação a sua ação *in vivo*, visto que sua biodisponibilidade é o principal obstáculo em relação a seu uso terapêutico. Para responder essa questão, dosamos a curcumina no cérebro de ratos após a administração oral, e concluímos que ela chega ao SNC.

Além da constatação da chegada e permanência da curcumina no SNC, também é importante pontuar que existem divergências em relação aos resultados em modelos de administração periférica e central de LPS, e que é possível que a curcumina atue na periferia quando o LPS é administrado via intraperitoneal. Mesmo assim, a curcumina possui importante ação protetora no comportamento locomotor dos animais com comportamento doente.

A curcumina possui efeito anti-inflamatório, antioxidante e é um importante inibidor da secreção de S100B, dado que foi observado tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Apesar dos efeitos promissores, ainda é necessário caracterizar a distribuição da curcumina no SNC, e questionar

os modelos utilizados para estudar seus efeitos no SNC, visto que, em modelos de administração periférica de LPS, a curcumina pode estar agindo mais na periferia.

6. Conclusões

Através de nossos resultados, podemos concluir que a curcumina é uma molécula promissora para o desenvolvimento de estratégias anti-inflamatórias para o SNC. Por ser uma molécula de baixo custo e amplamente encontrada na natureza, a ingestão via oral de curcumina, em conjunto com a adoção de hábitos de vida saudáveis, pode integrar o conjunto de estratégias preventivas simples e não-invasivas para a redução do risco de doenças neurodegenerativas. Sua capacidade de atravessar a BHE e exercer efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes no cérebro também a torna uma candidata para o desenvolvimento de drogas que visam atenuar a exacerbação da resposta inflamatória central.

7. Perspectivas futuras

- Investigar diferentes tempos de tratamento com LPS + curcumina em culturas de astrócitos;
- Ampliar a caracterização da resposta inflamatória em culturas de astrócitos, com e sem o tratamento com curcumina e piperina, através da dosagem do imunoconteúdo de TLR4, COX-2 e avaliar a translocação de NFκB através de imunocitoquímica;
- Utilizar inibidores de PPAR-γ para observar se o efeito anti-inflamatório da curcumina em astrócitos é através de sua ligação com este receptor;
- Investigar possíveis receptores acoplados a proteína G inibitória, cuja interação com a curcumina em astrócitos poderia resultar na redução da secreção de S100B;
- Administrar curcumina e piperina via oral, para observar se a piperina pode potencializar os efeitos da curcumina e ampliar a proteção anti-inflamatória e antioxidante;

- Realizar dosagem de curcumina em diferentes estruturas cerebrais após a administração via oral;

- Realizar as mesmas dosagens bioquímicas feitas 72 horas após a cirurgia estereotáxica para administração ICV de LPS em tempos menores, como 24 e 48 horas.

8. Apoio financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, bem como da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN).

9. Referências bibliográficas

ABDOLLAHI, E. et al. Therapeutic effects of curcumin in inflammatory and immune-mediated diseases: A nature-made jack-of-all-trades? **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 2, p. 830–848, fev. 2018.

ABORODE, A. T. et al. Targeting Oxidative Stress Mechanisms to Treat Alzheimer's and Parkinson's Disease: A Critical Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1–9, 31 jul. 2022.

ANAND, P. et al. **Bioavailability of curcumin: problems and promises**. **Mol Pharm**, 2007.

ASHRAFIZADEH, M. et al. Curcumin Activates the Nrf2 Pathway and Induces Cellular Protection Against Oxidative Injury. **Current Molecular Medicine**, v. 20, n. 2, p. 116–133, 14 jan. 2020.

ASKARIZADEH, A. et al. Neuroprotection by curcumin: A review on brain delivery strategies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 585, p. 119476, jul. 2020.

BANKS, W. A.; ROBINSON, S. M. Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood–brain barrier. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 1, p. 102–109, jan. 2010.

BARATEIRO, A. et al. **S100B as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in Multiple Sclerosis**. **Mol Neurobiol**, 2016.

BEGUM, A. N. et al. **Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease**. **J Pharmacol Exp Ther**, 2008.

BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. **The role of astroglia in neuroprotection.** *Dialogues Clin Neurosci*, 2009.

BERNARDO, A. et al. Curcumin promotes oligodendrocyte differentiation and their protection against TNF- α through the activation of the nuclear receptor PPAR- γ . *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 4952, 2 mar. 2021.

BOOZARI, M.; BUTLER, A. E.; SAHEBKAR, A. Impact of curcumin on toll-like receptors. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n. 8, p. 12471–12482, ago. 2019.

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*, 2016.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 23 jan. 2018.

COLOMBO, E.; FARINA, C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends in Immunology*, v. 37, n. 9, p. 608–620, set. 2016.

CUMMINGS, J. et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2023. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, v. 9, n. 2, p. e12385, abr. 2023.

DA RÉ, C. et al. **Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide leads to memory impairment and alterations in hippocampal leptin signaling.** *Behav Brain Res*, 2020.

DELABY, C.; HIRTZ, C.; LEHMANN, S. Overview of the blood biomarkers in Alzheimer's disease: Promises and challenges. *Revue Neurologique*, v. 179, n. 3, p. 161–172, mar. 2023.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. **Neuroinflammation: the devil is in the details.** *J Neurochem*, 2016.

DONATO, R. et al. **S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal.** *Biochim Biophys Acta*, 2009.

DUBEY, S. K. et al. **Design, synthesis and characterization of some bioactive conjugates of curcumin with glycine, glutamic acid, valine and demethylenated piperic acid and study of their antimicrobial and antiproliferative properties.** *Eur J Med Chem*, 2008.

EISENBERGER, N. I. et al. In Sickness and in Health: The Co-Regulation of Inflammation and Social Behavior. *Neuropsychopharmacology*, v. 42, n. 1, p. 242–253, jan. 2017.

ERFEN, Ş.; AKBAY ÇETIN, E. **Therapeutic and Preventive Effects of Piperine and its Combination with Curcumin as a Bioenhancer Against Aluminum-Induced Damage in the Astrocyte Cells.** *Neurotox Res*, 2022.

ESCARTIN, C. et al. **Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions.** *Nat Neurosci*, 2021.

FORSHAMMAR, J. et al. **Naloxone and ouabain in ultralow concentrations restore Na⁺/K⁺-ATPase and cytoskeleton in lipopolysaccharide-treated astrocytes.** *J Biol Chem*, 2011.

- GONÇALVES, C.-A.; CONCLI LEITE, M.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 10–11, p. 755–763, jul. 2008.
- GOYAL, A. et al. S100b as a Prognostic Biomarker in Outcome Prediction for Patients with Severe Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 30, n. 11, p. 946–957, jun. 2013.
- GRADIŠAR, H. et al. MD-2 as the target of curcumin in the inhibition of response to LPS. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 4, p. 968–974, 1 out. 2007.
- GUERRA, M. C. et al. **Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats.** **J Neuroinflammation**, 2011.
- GUILLEMOT-LEGRIS, O.; MUCCIOLI, G. G. **Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus.** **Trends Neurosci**, 2017.
- HARADA, N. et al. **Curcumin activates G protein-coupled receptor 97 (GPR97) in a manner different from glucocorticoid.** **Biochem Biophys Res Commun**, 2022a.
- HARADA, N. et al. **Identification of G protein-coupled receptor 55 (GPR55) as a target of curcumin.** **NPJ Sci Food**, 2022b.
- HEITHOFF, B. P. et al. Astrocytes are necessary for blood–brain barrier maintenance in the adult mouse brain. **Glia**, v. 69, n. 2, p. 436–472, fev. 2021.
- HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 358–372, jun. 2015.
- HOEHLE, S. I. et al. Metabolism of Curcuminoids in Tissue Slices and Subcellular Fractions from Rat Liver. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 756–764, 1 fev. 2006.
- JANGRA, A. et al. **Piperine Augments the Protective Effect of Curcumin Against Lipopolysaccharide-Induced Neurobehavioral and Neurochemical Deficits in Mice.** **Inflammation**, 2016.
- JIN, C. et al. Curcumin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 10, p. 1645–1651, out. 2007.
- KAMPHUIS, W. et al. Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer’s disease. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 3, p. 492–510, mar. 2014.
- KANDEL, E. et al. **Princípios de Neurociências - 5.ed.** [s.l.] AMGH Editora, 2014.
- KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 3, p. 154–159, mar. 2002.
- LABOURDETTE, G.; MANDEL, P. **Effect of norepinephrine and dibutyryl cyclic AMP on S-100 protein level in C6 glioma cells.** **Biochem Biophys Res Commun**, 1980.

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*, 2009.

LI, D.; WU, M. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 291, 4 ago. 2021.

LI, L. et al. Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 91, p. 740–755, jan. 2021.

LI, Y. et al. **Piperine mediates LPS induced inflammatory and catabolic effects in rat intervertebral disc.** *Int J Clin Exp Pathol*, 2015.

LU, S. C. **Glutathione synthesis.** *Biochim Biophys Acta*, 2013.

MA, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 401–426, 6 jan. 2013.

MARTINS, C. A. et al. **Curcumin in Combination with Piperine Suppresses Osteoclastogenesis In Vitro.** *J Endod*, 2015.

MICHETTI, F. et al. **The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury.** *J Neurochem*, 2019.

PAN, M. H.; HUANG, T. M.; LIN, J. K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 27, n. 4, p. 486–494, abr. 1999.

PARPURA, V. et al. **Glial cells in (patho)physiology.** *J Neurochem*, 2012.

PENG, Y. et al. **Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures.** *Drug Des Devel Ther*, 2021.

PINTO, S. S. et al. **Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology.** *FEBS Lett*, 2000.

PRIYADARSINI, K. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 1 dez. 2014.

PULIDO-MORAN, M. et al. Curcumin and Health. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 264, 25 fev. 2016.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, maio 2011.

RODRÍGUEZ, J. J. et al. Enriched environment and physical activity reverse astroglial degeneration in the hippocampus of AD transgenic mice. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 6, p. e678–e678, 20 jun. 2013.

ROSA, J. M. et al. Physical exercise prevents amyloid β 1–40-induced disturbances in NLRP3 inflammasome pathway in the hippocampus of mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 2, p. 351–359, fev. 2021.

SANDBERG, M. et al. NRF2-regulation in brain health and disease: Implication of cerebral inflammation. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 298–306, abr. 2014.

SEMMLER, A. et al. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 30, n. 2–3, p. 144–157, out. 2005.

SEYEDZADEH, M. H. et al. **Study of curcumin immunomodulatory effects on reactive astrocyte cell function.** **Int Immunopharmacol**, 2014.

SHOBA, G. et al. **Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers.** **Planta Med**, 1998.

SKRZYPCZAK-WIERCIOCH, A.; SAŁAT, K. Lipopolysaccharide-Induced Model of Neuroinflammation: Mechanisms of Action, Research Application and Future Directions for Its Use. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5481, 26 ago. 2022.

SOFRONIEW, M. V. **Astroglisis.** **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2014.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. **Astrocytes: biology and pathology.** **Acta Neuropathol**, 2010.

SORRENTI, V. et al. **Curcumin Prevents Acute Neuroinflammation and Long-Term Memory Impairment Induced by Systemic Lipopolysaccharide in Mice.** **Front Pharmacol**, 2018.

STRIDH, M. H. et al. **Enhanced glutathione efflux from astrocytes in culture by low extracellular Ca²⁺ and curcumin.** **Neurochem Res**, 2010.

SUGIMOTO, M. A. et al. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? **Frontiers in Immunology**, v. 7, 26 abr. 2016.

TSAI, Y.-M. et al. Curcumin and its nano-formulation: The kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 1, p. 331–338, set. 2011.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, nov. 2014.

TYAGI, E. et al. **Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain.** **J Neuroimmunol**, 2008.

VARGAS-CARAVEO, A. et al. Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13113, 13 out. 2017.

WAHLSTRÖM, B.; BLENNOW, G. A Study on the Fate of Curcumin in the Rat. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 43, n. 2, p. 86–92, 13 mar. 1978.

WAISE, T. M. Z. et al. One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 464, n. 4, p. 1157–1162, set. 2015.

WANG, D. D.; BORDEY, A. **The astrocyte odyssey**. **Prog Neurobiol**, 2008.

WANG, J. et al. Molecular Mechanisms of Glutamate Toxicity in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 585584, 26 nov. 2020.

WANG-SHENG, C. et al. Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 44–48, jan. 2017.

WU, D. et al. The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 217, 25 maio 2023.

YONG, S. J. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. **Infectious Diseases**, v. 53, n. 10, p. 737–754, 3 out. 2021.

YOUN, H. S. et al. **Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin**. **Biochem Pharmacol**, 2006.

YU, S. et al. Curcumin exerts anti-inflammatory and antioxidative properties in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺)-stimulated mesencephalic astrocytes by interference with TLR4 and downstream signaling pathway. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 4, p. 697–705, jul. 2016.

ZHANG, J. et al. **Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/ TLR4/ NF- κ B pathways in BV2 cells**. **Mol Immunol**, 2019.

Anexo I – Carta de aprovação da comissão no uso de animais do capítulo I



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 33850

Título: Efeito da Curcumina e Piperina, Compostos Presente no Curry, em Cultura Primária de Astrócitos de Ratos Wistar em Condições Normais ou Inflamatórias

Vigência: 01/10/2017 à 30/09/2019

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARINA CONCLI LEITE - coordenador desde 01/10/2017
CARLOS ALBERTO SARAIVA GONCALVES - pesquisador desde 01/10/2017
FERNANDA CAROLINA TELLES DA SILVA FRÖES - Outra Função desde 01/10/2017
MARINA PEDRA SEADY - Aluno de Mestrado desde 01/10/2017

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 18/12/2017 - Sala 330 do Anexo I do Prédio da Reitoria- Campus Centro - UFRGS - Bairro Farroupilha - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 242 Ratos Wistar com idade entre 1 a 4 dias, machos ou fêmeas, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 4 de Janeiro de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética

Anexo II – Carta de aprovação da comissão no uso de animais do capítulo II



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37438

Título: Investigação do papel da curcumina na neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo

Vigência: 11/06/2019 à 10/06/2023

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARINA CONCLI LEITE - coordenador desde 11/06/2019
CARLOS ALBERTO SARAIVA GONCALVES - pesquisador desde 11/06/2019
FERNANDA CAROLINA TELLES DA SILVA FRÓES - Aluno de Doutorado desde 11/06/2019
GABRIEL HENRIQUE SCHIRMBECK - Aluno de Doutorado desde 11/06/2019
MARINA PEDRA SEADY - Aluno de Doutorado desde 11/06/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 02/09/2019 - Sala 56 do prédio 11209-Salas de Aula do Campus Centro/UFRGS/R. Sarmento Leite, 425, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de um total de 558 ratos, sendo 420 ratos machos da colônia Wistar, com 60 dias de idade, e 138 neonatos de 1 a 4 dias, machos ou fêmeas, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL-UFRGS); de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 13 de Setembro de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética