

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

Marina Pedra Seady

**EFEITO DA CURCUMINA E PIPERINA, COMPOSTOS PRESENTE NO CURRY,  
EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS DE RATOS WISTAR EM  
CONDIÇÕES NORMAIS OU INFLAMATÓRIAS**

Porto Alegre

2018

Marina Pedra Seady

**EFEITO DA CURCUMINA E PIPERINA, COMPOSTOS PRESENTE NO CURRY,  
EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS DE RATOS WISTAR EM  
CONDIÇÕES NORMAIS OU INFLAMATÓRIAS**

Dissertação 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 mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marina Concli Leite

Porto Alegre

2018

Dedico este trabalho aos meus pais, por  
me mostrarem que a educação vale a pena.

## AGRADECIMENTOS

À minha grande família Pedra Seady, pelo amor incondicional. Aos meus pais, Hamilton e Andréa, pelo exemplo de pais que são, por não me deixarem desistir e pela força que me passam. Ao meu irmão Matheus, por me mostrar que amor de irmão é diferente de todos os outros, e por me visitar em Porto Alegre.

Ao Rafa, por superar comigo todas as fases difíceis, e se alegrar nos momentos de felicidade. Também por me ajudar a me tornar uma pessoa e profissional melhor.

Às minhas amigas Ana, Clau, Carol e Roberta por estarem tão longe, mas sempre tão perto.

Aos colegas do laboratório 33 pela companhia e por me chamarem do mesmo apelido que meu avô me chamava. Ao professor Carlos Alberto pelas opiniões e pelo aprendizado.

Ao laboratório 31: Fê Froes, por me aguentar e incentivar diariamente durante as rotinas da cultura; Caroll, pelas conversas sobre assuntos culturais e pelo carinho que tem comigo; Gabriel, pelas ajudas na bancada, nas aulas e pelo senso de humor; Jéssica, pela companhia, por me ajudar e escutar pacientemente; Jé, Fran, Júlia, Jéfeli e Jose pelo suporte mais do que essencial. À Fafá, por me ensinar a fazer praticamente tudo que eu sei na bancada e por me inspirar como cientista e pessoa.

À minha orientadora Marina Leite, por ser a melhor orientadora que alguém poderia ter. Por me escutar, aconselhar, tranquilizar... E por me possibilitar falar sempre com muito orgulho, a todos que perguntam: minha orientadora é maravilhosa.

À UFRGS e ao PPG Bioquímica por me permitirem realizar esse trabalho.

Ao apoio financeiro: CNPq, CAPES e Fapergs.

## ÍNDICE

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
1. Introdução.....	5
1.1. Curcumina e Piperina.....	5
1.2. Efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC).....	8
1.3. Neuroinflamação.....	10
1.4. Astrócitos .....	11
2. Objetivos .....	15
2.1. Objetivo geral .....	15
2.2. Objetivos específicos .....	15
3. Metodologia .....	15
3.1. Materiais .....	15
3.2. Cultura de Astrócitos .....	16
3.3. Delineamento Experimental .....	16
3.3.1. Efeito da curcumina ou piperina sobre parâmetros astrocíticos.....	16
3.3.2. Efeito da curcumina, da piperina e da combinação das duas sobre a sinalização inflamatória induzida por LPS em astrócitos. ....	17
3.4. Redução de MTT .....	17
3.5. Incorporação de vermelho neutro (VN).....	18
3.6. Atividade da lactato desidrogenase extracelular (LDH).....	18
3.7. Iodeto de propídeo .....	18
3.8. Imunoconteúdo e secreção de S100B .....	18
3.9. Imunoconteúdo de GFAP .....	19
3.10. Captação de glutamato .....	19
3.11. Atividade da GS .....	20
3.12. Conteúdo de GSH.....	20
3.13. Secreção de Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	20
3.14. Imunocitoquímica para actina .....	21
3.15. Dosagem de Proteínas .....	21
3.16. Análise Estatística .....	21
4. Resultados .....	21

4.1.	Efeito da curcumina ou da piperina em astrócitos em condições basais .....	22
4.1.1.	Efeito da curcumina ou da piperina sobre a viabilidade e morfologia celular. ..	22
4.1.2.	Efeito da curcumina ou da piperina sobre o metabolismo glutamatérgico.....	25
4.1.3.	A curcumina causa alteração na secreção de S100B e no conteúdo de GFAP ..	26
4.2.	Efeito da incubação de curcumina e piperina em condições inflamatórias .....	28
4.2.1.	A curcumina e piperina revertem o aumento da secreção de TNF- $\alpha$ causado pelo LPS .....	28
4.2.2.	A secreção de S100B é diminuída pelo LPS .....	29
4.2.3.	A piperina reverte o aumento de GFAP causado pelo LPS.....	30
5.	Discussão.....	31
5.1.	Efeito da curcumina e da piperina em astrócitos .....	31
5.2.	Efeito da curcumina e piperina em condições inflamatórias .....	34
6.	Conclusão .....	38
7.	Perspectivas.....	39
8.	Apoio financeiro.....	39
9.	Referências Bibliográficas .....	40

## RESUMO

A curcumina é o componente mais estudado presente na *Curcuma longa*, que é um dos principais compostos do curry. A curcumina é um agente com ação antioxidante e anti-inflamatória, sendo responsável por diminuir a secreção de citocinas pro-inflamatórias e inibir fatores de transcrição envolvidos na sinalização inflamatória. Apesar de seus efeitos benéficos, a curcumina possui uma baixa biodisponibilidade oral, o que dificulta seu uso terapêutico. Assim como a curcumina, a piperina também é encontrada no curry e, interessantemente, a ingestão concomitante desses dois compostos parece aumentar a biodisponibilidade oral da curcumina em cerca de 20 vezes devido ao seu efeito de inibir o processo de glicuronidação intestinal sofrido por ela. A piperina é o principal componente da pimenta preta (*Piper nigrum*), e também possui ação anti-inflamatória. A curcumina e a piperina são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica em modelos de inflamação *in vivo*. Em doenças neurodegenerativas, a resposta inflamatória participa do processo patológico, sendo ativada em resposta ao dano neurológico. Especificamente no sistema nervoso central, a resposta ao dano é mediada principalmente pela microglia e pelos astrócitos, sendo os astrócitos importantes no processo de recuperação após a lesão, dando suporte aos neurônios para a manutenção de contatos sinápticos. Os astrócitos também atuam na detoxificação da amônia e do glutamato, reciclando o mesmo para o neurônio, por meio da enzima glutamina sintetase. Ainda, atuam na resposta antioxidante cerebral, através da síntese de glutathione. Apesar da importância dos astrócitos na manutenção do sistema nervoso central e dos efeitos anti-inflamatórios periféricos da piperina e da curcumina, poucos estudos têm sido realizados sobre os efeitos dos compostos em parâmetros de funções astrocíticas. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da curcumina ou piperina, bem como a ação conjunta desses dois compostos em astrócitos em condições basais ou inflamatórias. Para isso, utilizamos culturas de astrócitos corticais de ratos Wistar neonatos, que cresceram até a confluência (21 dias) em meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino. Em condições basais, a concentração de 50  $\mu\text{M}$  de curcumina aumentou o conteúdo de glutathione, sugerindo melhora no perfil antioxidante celular. Ainda, a mesma concentração diminuiu a secreção de S100B e aumentou o conteúdo de GFAP. A piperina não demonstrou alteração nos parâmetros avaliados em condições basais. Em condições inflamatórias, tanto a curcumina e a piperina isoladamente quanto a combinação dos dois compostos reverteu a níveis basais o aumento da secreção de TNF- $\alpha$  causado pelo LPS. A piperina demonstrou reverter o aumento do conteúdo de GFAP causado pelo LPS. Apesar de não demonstrarem efeitos sinérgicos, a curcumina e a piperina mostraram efeitos complementares importantes. Portanto, a utilização dos dois compostos juntos, em nosso estudo, resultou em efeitos biológicos relevantes e promissores para a proteção anti-inflamatória no sistema nervoso central.

## ABSTRACT

Curcumin is the most studied component of *Curcuma longa* and is one of the main curry compounds. Curcumin is an agent with antioxidant and anti-inflammatory action, decreasing the secretion of pro-inflammatory cytokines and activation of transcription factors involved in inflammatory signaling. Despite its beneficial effects, curcumin has a low oral bioavailability, which makes its therapeutic use difficult. As curcumin, piperine is also found in curry and, interestingly, the concomitant intake of these two compounds appears to increase the oral bioavailability of curcumin by about 20-fold due to piperine inhibiting effect on the intestinal glucuronidation process undergone by it. Piperine is the main component of black pepper (*Piper nigrum*), and also has anti-inflammatory effects. Curcumin and piperine are able to cross the blood-brain barrier in *in vivo* inflammation models. In neurodegenerative diseases, the inflammatory response participates in the pathological process, being activated as a response to neurological damage. Specifically in the central nervous system, the response to damage is mediated primarily by microglia and astrocytes, being the astrocytes important to support neurons after injury in order to maintain long-term synaptic contacts. Astrocytes also act in the detoxification of ammonia and glutamate, recycling it to the neuron, through the action of the enzyme glutamine synthetase. Furthermore, they act on the brain antioxidant response, through the synthesis of glutathione. Despite the importance of astrocytes in the maintenance of the central nervous system and the peripheral anti-inflammatory effects of piperine and curcumin, there are not many studies been carried out on the mechanisms of action of these compounds in parameters of astrocytic functions. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of curcumin or piperine, as well as the combined action of these two compounds in astrocytes under basal or inflammatory conditions. We used primary astrocyte culture obtained from cortices of newborn Wistar rats, which were allowed to reach confluence (21 days) in culture medium supplemented with fetal calf serum. At basal conditions, the concentration of 50  $\mu$ M curcumin increased glutathione content, suggesting an improvement in the cellular antioxidant profile. Furthermore, the same concentration decreased the secretion of S100B and increased GFAP content. Piperine did not alter any of the parameters evaluated in basal conditions. Under inflammatory conditions, both curcumin and piperine alone or combined reversed, at baseline levels, the increased secretion of TNF- $\alpha$  induced by LPS. Piperine was shown to reverse the increase in GFAP content caused by LPS. Although curcumin and piperine did not demonstrate synergistic effects, they showed important complementary effects. Therefore, the use of these two compounds together in our study resulted in relevant and promising biological effects for anti-inflammatory protection in the central nervous system.



## LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE – barreira hematoencefálica

COX-2 - ciclooxigenase-2

DMSO - dimetilsulfóxido

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

EAATs – do inglês “excitatory amino acid transporters”

GFAP - proteína glial fibrilar ácida

GCL - glutamato cisteína ligase

GS - glutamina sintetase

GSH – glutathiona reduzida

GSS – GSH sintetase

HBSS - solução salina equilibrada de hanks

IL – interleucina

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

LDH – lactato desidrogenase

LPS - lipopolissacarídeo derivado de *Escherichia coli*

MTT – do inglês “methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide”

NFκB - fator nuclear kappa B

OPD - o-fenilenediamina

OPT – phthaldialdehyde

PPARs - receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

RAGE - receptor para produtos finais de glicação avançada

SFB - soro fetal bovino

SNC - sistema nervoso central

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral- $\alpha$

TLR - receptores toll-like

TrkB- receptor de tropomiosina cinase B

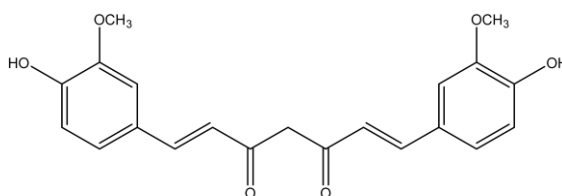
VN - vermelho neutro

## 1. Introdução

Nos últimos anos, os compostos bioativos encontrados nos alimentos têm sido estudados como alternativas para prevenir ou auxiliar no tratamento de diversas patologias. Por serem encontrados abundantemente na natureza e por se tratarem de moléculas com baixa toxicidade e de baixo custo de obtenção, esses compostos podem ser interessantes alvos para a formulação de novos medicamentos e enriquecimento da alimentação. Isso pode contribuir para melhorar a qualidade de vida de pacientes, especialmente aqueles que vivem em condições patológicas com poucas opções de tratamento. Esses compostos geralmente possuem uma importante atividade antioxidante e anti-inflamatória, atenuando processos patológicos comuns a diversas doenças como as doenças neurodegenerativas, câncer e doenças autoimunes. Dentre os compostos já estudados se encontram os flavonoides, as catequinas e os polifenóis (Scapagnini *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2014).

### 1.1. Curcumina e Piperina

A curcumina é um composto polifenólico (Figura 1), sendo o componente mais estudado da *Curcuma longa*, que pertence à família Zingiberaceae e também é conhecida como açafrão-da-terra, cúrcuma, turmérico, açafrão-da-índia, açafrão ou gengibre amarelo. É uma planta originária da Índia e cultivada em todo o mundo tropical para uso medicinal e condimentar (Pereira e Moreira, 2009), sendo um dos principais compostos do curry.



**Figura 1. Estrutura Química da Curcumina.** (Zheng *et al.*, 2016)

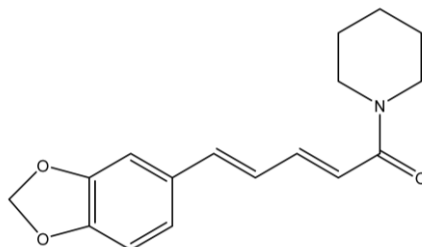
A curcumina é uma molécula pleitrópica, com múltiplos alvos moleculares e baixa toxicidade (Chainani-Wu, 2003; Sorrenti *et al.*, 2018). Dentre as diversas propriedades da curcumina, inclui-se a ação antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória. Muitos dos alvos moleculares da curcumina são da sinalização inflamatória e efeitos como a diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL). Em uma linhagem celular de macrófagos, a curcumina diminuiu a secreção de IL-6 em um modelo de inflamação induzido por LPS (Liang *et al.*, 2009); já em linhagens de monócitos, uma diminuição de IL-8 foi observada em um modelo de diabetes (Jain *et al.*, 2009); e em cultura de linfócitos, ocorreu a diminuição da expressão de IL-12 em um modelo de proliferação induzida por antígeno (Gao *et al.*, 2004; Aggarwal *et al.*, 2013). Ainda, em estudos *in vitro*, foi mostrado uma diminuição da expressão do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a nível transcricional pela curcumina em células do epitélio intestinal, em um modelo de inflamação (Kaur *et al.*, 2018). Da mesma forma, a redução da expressão transcricional e uma diminuição da sua secreção também foi demonstrada com a incubação de demetoxicurcumina, outro curcuminóide presente na cúrcuma, em um modelo de inflamação em linhagem celular de microglia. (Zhang *et al.*, 2010; Aggarwal *et al.*, 2013).

A curcumina também mostrou diminuir a translocação de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) em um modelo *in vivo* de edema pulmonar induzido por hipóxia, no qual a curcumina foi administrada via oral e inibiu a translocação cerca de quatro vezes em comparação ao modelo de edema (Sarada *et al.*, 2008). Outro fator de transcrição que parece estar envolvido na ação da curcumina é o fator nuclear relacionado ao fator eritroide-2 (Nrf2), mostrado em células musculares e hepáticas (Sahin *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2017).

Apesar de seus efeitos benéficos, a curcumina possui uma baixa biodisponibilidade oral, principalmente pelo extenso mecanismo de glicuronidação e sulfatação intestinal, o que

dificulta seu uso terapêutico. Além disso, sabe-se que a curcumina é capaz de se ligar a inúmeras proteínas no soro, incluindo a albumina (Begum *et al.*, 2008; Aggarwal *et al.*, 2013). Para melhorar a biodisponibilidade, diversas alternativas têm sido propostas. Dentre elas, o uso da curcumina no desenvolvimento de nanopartículas, lipossomas, micelas, complexos fosfolipídicos e fitossomas (Mirzaei *et al.*, 2017). Além disso, a ação sinérgica com outros compostos pode ser uma alternativa.

Assim como a curcumina, a piperina também é encontrada no curry e, interessante, a ingestão concomitante desses dois compostos parece aumentar sua biodisponibilidade oral em cerca de 20 vezes (Shoba *et al.*, 1998). Isso devido ao efeito da piperina em inibir o processo de glicuronidação intestinal sofrido pela curcumina. A piperina é o alcaloide mais encontrado na pimenta preta (*Piper nigrum*) (Figura 2), e foi historicamente utilizada na medicina chinesa como tratamento para epilepsia.



**Figura 2. Estrutura Química da Piperina.** (Zheng *et al.*, 2016)

A piperina possui ação anti-inflamatória, através da diminuição da translocação de NFκB demonstrada em um modelo *in vivo* de lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Além de inibir de forma dose-dependente essa ativação, a piperina ainda inibiu a degradação de IκBα, proteína inibidora da translocação do NFκB (Lu *et al.*, 2016). Além dessa ação, a piperina também mostrou diminuir a expressão das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF-α em células do disco intervertebral em um modelo *in vitro* de inflamação induzida por LPS (Li *et al.*, 2015). O mesmo padrão de melhora no perfil anti-inflamatório foi observado em um modelo *in vitro* de

endometrite, uma inflamação no endométrio gerada por *Staphylococcus aureus*, no qual a piperina foi capaz de diminuir a expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$  (Fu *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2016; Zhai *et al.*, 2016).

Além da melhora na biodisponibilidade da curcumina, o efeito benéfico observado como tratamento combinado pode ser devido a um sinergismo entre as moléculas. Os efeitos sinérgicos da curcumina e piperina já foram descritos em linhagens de fibroblastos e de sarcoma osteogênico, nas quais a combinação dos dois compostos suprimiu completamente a osteoclastogênese, processo que degrada o tecido ósseo (Martins *et al.*, 2015). Esse efeito pode ser devido a uma melhora na solubilidade, facilidade na captação pela célula e diminuição da velocidade do processo metabólico da curcumina quando combinada com a piperina (Dubey *et al.*, 2008).

## 1.2. Efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC)

A curcumina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) em modelos de Alzheimer *in vivo*, bem como de bloquear a agregação de peptídeo beta-amiloide (Yang *et al.*, 2005). No SNC, já foi descrita a atenuação da inflamação gerada pela microglia e a diminuição do dano cognitivo gerado por um modelo inflamatório induzido por LPS, em estudos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (Chen *et al.*, 2018; Sorrenti *et al.*, 2018). No mesmo estudo com modelo de inflamação aguda *in vivo*, foram detectadas concentrações biologicamente relevantes da curcumina e seus metabólitos no tecido cerebral 3 h após administração via gavagem (Sorrenti *et al.*, 2018).

Ainda, um estudo utilizando dados da *Singapore National Mental Health Survey of the Elderly* com indivíduos de múltiplas etnias sugere que um maior consumo de curry na alimentação resulte em incidências menores de doenças neurodegenerativas. Esse estudo

comparou a performance cognitiva e o consumo de curry em adultos entre 60 e 93 anos (Ng *et al.*, 2006).

Quanto à passagem da piperina pela BHE, a mesma mostrou ter alta permeabilidade em modelos *in vitro* de BHE, indicando possibilidade de passagem (Eigenmann *et al.*, 2016). Recentemente, foi demonstrado que a piperina foi capaz de reduzir o dano nas células de Purkinje encontradas no cerebelo de ratos em um modelo de ataxia espinocerebelar. A ataxia espinocerebelar é uma doença neurodegenerativa causada pela expansão de poliglutamina na proteína de ligação TATA, um fator de transcrição, gerando uma degeneração preferencial nos neurônios cerebelares de Purkinje. Nessa condição, a piperina foi administrada via gavagem por dois meses em ratos, tratamento que resultou em um aumento na sobrevivência das células de Purkinje e a manutenção da sua estrutura morfológica. Ainda, os ratos tratados com piperina tiveram melhor desempenho motor em comparação aos animais do grupo controle (Guo *et al.*, 2018).

O aumento da biodisponibilidade da curcumina pela piperina já foi testado em um ensaio em camundongos em um modelo de depressão, no qual os animais receberam curcumina e piperina isolados ou combinados via oral por 7 dias, seguidos da administração de lipopolissacarídeo isolado de *Escherichia coli* (LPS). Nesse estudo, os ratos tratados com ambos os compostos tiveram desempenho superior aos grupos tratados com os compostos isolados, e a ação anti-inflamatória da combinação de curcumina e piperina também diminuiu de forma expressiva a sinalização inflamatória do modelo (Jangra *et al.*, 2016). Em um modelo de senescência em ratos, o tratamento combinado de curcumina e piperina mostrou melhores resultados que o tratamento isolado com os compostos no que diz respeito ao perfil antioxidante (níveis de malondialdeído, superóxido dismutase, glutathiona reduzida (GSH) e catalase), bem como à integridade da estrutura neuronal. A curcumina e a piperina atuaram conjuntamente na

manutenção do citoesqueleto, integridade e homeostase intracelular devido à sua importante ação antioxidante (Banji *et al.*, 2013). Apesar de estudos mostrarem uma melhora na biodisponibilidade da curcumina pela piperina, o que conseqüentemente melhora sua ação protetora, ainda não há estudos que mostrem sinergismo de efeitos *in vitro* em células do SNC.

Dessa forma, se torna interessante o estudo dos efeitos da curcumina e da piperina em células do SNC para compreender os efeitos dos compostos isoladamente e se podem agir sinergicamente em situações normais, bem como frente a insultos que possam gerar respostas como a neuroinflamação.

### 1.3. Neuroinflamação

Em doenças neurodegenerativas, a inflamação participa do processo patológico, sendo ativada em resposta ao dano neurológico, seja ele agudo ou crônico, na forma de liberação de mediadores inflamatórios (Alam *et al.*, 2016). O objetivo desse processo é de proteger o corpo humano contra infecções e traumas, porém, em circunstâncias particulares, esse processo pode ser exacerbado, sendo ativado de forma crônica e perpetuando além do tempo necessário, produzindo assim um dano maior do que aquele que originou a inflamação.

O processo de inflamação pode ser iniciado em resposta à um trauma mecânico, resposta imune, inflamação sistêmica e também está presente nas doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Alam *et al.*, 2016). A inflamação crônica tem um papel importante tanto na iniciação quanto na progressão de quadros patológicos envolvendo o SNC. A obesidade, por exemplo, é um quadro associado com inflamação de baixo grau nos tecidos periféricos, que tem sido relacionada com neuroinflamação e prejuízo cognitivo (Miller e Spencer, 2014). No processo inflamatório no SNC, os fatores que levam ao estresse, seja crônico ou agudo, estimulam a microglia e os astrócitos a ativar vias inflamatórias que envolvem os receptores toll-like (TLR), fatores de transcrição como NFκB e citocinas pró-



inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10. Essa ativação pode desencadear a neurodegeneração, ou contribuir para sua progressão, visto que a ativação de fatores comuns à neuroinflamação podem gerar dano à BHE (Alam *et al.*, 2016; Varatharaj e Galea, 2017; Wang *et al.*, 2018). A resposta ao dano no SNC é uma resposta multicelular que, além de envolver a glia, envolve os neurônios e células não-neurais como as células do endotélio, fibroblastos perivasculares, pericitos e células da meninge (Sofroniew, 2014).

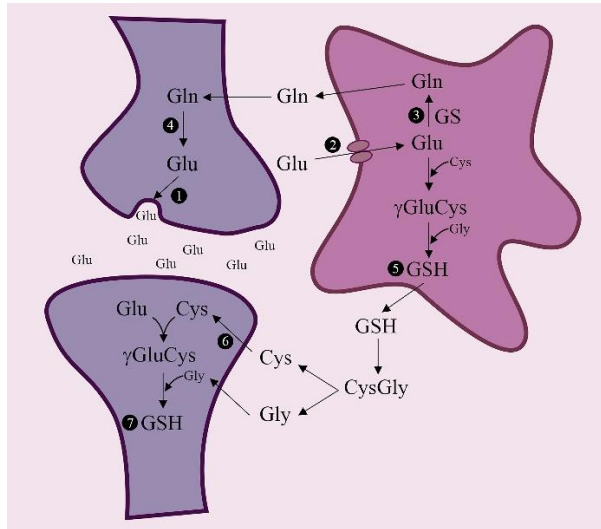
Em estudos *in vitro* e *in vivo*, a neuroinflamação pode ser gerada por LPS, um componente de parede de bactérias gram negativas que gera uma ativação do sistema imune inato e de vias de sinalização da inflamação, através da ligação ao receptor TLR4 (Youn *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2011; Varatharaj e Galea, 2017). Nesse contexto, a resposta inflamatória é gerada principalmente pelas células da glia, que incluem a microglia e os astrócitos. A microglia é responsável pela maior parte da resposta inflamatória primária após o dano ao SNC, visto que são as células representantes do sistema imune cerebral, ativando fatores de transcrição que produzem citocinas e quimiocinas inflamatórias (Disabato *et al.*, 2016). De fato, a microglia possui um papel primordial na resposta inflamatória, entretanto, os astrócitos possuem características fisiológicas imprescindíveis na manutenção de contatos sinápticos à longo prazo após o dano, possibilitadas por sua posição privilegiada em contato com vasos sanguíneos e com as sinapses (Sofroniew e Vinters, 2010).

#### 1.4. Astrócitos

Astrócitos são células do SNC que atuam na homeostase iônica, no metabolismo energético e na modulação da 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 e Vinters, 2010).

Dentre suas funções, os astrócitos promovem a maturação neuronal, auxílio na formação de sinapse e regulação da angiogênese (Wang e Bordey, 2008; Ransom e Ransom, 2012). Outra função importante dos astrócitos é atuar 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, como comentado anteriormente, confere aos astrócitos a possibilidade de realizar a manutenção de contatos sinápticos a longo prazo após uma lesão (Brown e Bal-Price, 2003; Sofroniew e Vinters, 2010; Parpura *et al.*, 2012).

A colaboração metabólica dos astrócitos com os neurônios é essencial para o funcionamento do SNC, tanto no metabolismo energético quanto na comunicação via sinapse tripartite. A sinapse tripartite envolve três elementos: astrócito, neurônio pré-sináptico e neurônio pós-sináptico (Figura 3). Na transmissão sináptica glutamatérgica, o neurônio pré-sináptico libera glutamato, que é então captado em sua maioria por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) astrocíticos (Parpura *et al.*, 2012). Esse glutamato captado é substrato para uma importante enzima responsável por algumas das funções astrocíticas, a glutamina sintetase (GS). Essa enzima é responsável pela síntese de glutamina a partir do glutamato e amônia, fazendo parte do chamado ciclo glutamina-glutamato, no qual a glutamina gerada é devolvida aos neurônios. Esse processo impede a excitotoxicidade do glutamato na fenda sináptica, além de detoxificar a amônia no SNC (Chan *et al.*, 2016).



**Figura 3. Metabolismo de Glutamato.** O glutamato é liberado na fenda sináptica (1) e removido pelos transportadores astrocíticos (2). Nos astrócitos, pode ser convertido em glutamina (3) que é liberada para o espaço extracelular, onde os neurônios podem captar e reciclar o glutamato (4), ou ainda convertido em GSH (5). A GSH é liberada pelos astrócitos e é degradada no meio extracelular, sendo a fonte da Cys (6) utilizada pelos neurônios para a sua síntese de GSH (7).

A enzima GS é expressa majoritariamente em astrócitos no SNC, o que a torna uma proteína marcadora desse tipo celular. O glutamato captado pelos astrócitos na fenda sináptica ainda pode estimular a glicólise nos astrócitos e gerar lactato, que pode ser transportado para os neurônios como combustível energético, em uma hipótese conhecida como lançadeira de lactato astrócito-neurônio (Magistretti *et al.*, 1993; Magistretti *et al.*, 1994).

Além da GS, os astrócitos podem ser identificados por outros marcadores específicos, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que desempenha importante função na arquitetura celular, no processo de astrogliose reativa e na formação de cicatriz glial (Wang e Bordey, 2008; Sofroniew e Vinters, 2010). A astrogliose pode acontecer na resposta a insultos no SNC e é caracterizada por um espectro de potenciais mudanças moleculares, celulares e funcionais. Dentre essas mudanças, pode-se citar a hipertrofia celular, resultando em uma regulação positiva no conteúdo de GFAP (Sofroniew, 2014).

Outro marcador que pode ser citado é a S100B, uma proteína ligante de cálcio expressa e secretada pelos astrócitos. A S100B pode exercer efeitos neurotróficos nos estágios iniciais de insultos ao SNC, efeitos observados em concentrações nanomolares em experimentos *in vitro*. Já em concentrações altas (superiores a 500 nM), a S100B pode exercer efeitos tóxicos. Em ambas as situações, seus efeitos são possivelmente mediados pela ligação da S100B ao receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) (Donato *et al.*, 2009). Por esse motivo, essa proteína tem sido proposta como um marcador da ativação astrogliar, visto que as alterações em sua concentração no SNC têm sido associadas com diversas doenças neurológicas (Sofroniew e Vinters, 2010; Guerra *et al.*, 2011).

No que diz respeito à atuação dos astrócitos na proteção antioxidante no SNC, o tripeptídeo GSH é a molécula mais importante. A GSH é formada pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato, e está envolvida nos processos de redução de moléculas oxidantes como o peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. A síntese de GSH nos astrócitos ocorre, primeiramente, através da ligação do glutamato com a cisteína, através da enzima glutamato cisteína ligase (GCL). Em seguida, o produto formado dessa reação se liga com a glicina, reação catalisada pela enzima GSH sintetase (GSS). É importante ressaltar que a GSH é sintetizada pelos astrócitos de forma mais expressiva do que as demais células do cérebro (Gegg *et al.*, 2003; Bélanger e Magistretti, 2009). Além da síntese, os astrócitos realizam um efluxo de GSH para o espaço extracelular, onde a molécula é clivada e a cisteína gerada nesse catabolismo é captada pelo neurônio através do receptor de glutamato EAAC1. Após captada, a cisteína é precursora de GSH no neurônio. Esse processo demonstra a importância da síntese de GSH pelos astrócitos na neuroproteção, bem como a relevância de compostos que possam estimular sua síntese e efluxo (Stridh *et al.*, 2010).

Mesmo sabendo-se da importância dos astrócitos na manutenção da homeostase do SNC e dos efeitos protetores periféricos da piperina e da curcumina, poucos estudos têm sido realizados sobre os mecanismos de ação desses compostos em parâmetros de funções astrocíticas.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da exposição de culturas primárias de astrócitos de rato à curcumina ou piperina, bem como a ação conjunta desses dois compostos em condições basais ou inflamatórias.

### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar o efeito da curcumina ou piperina em culturas primárias de astrócitos de ratos sobre parâmetros funcionais característicos desse tipo celular, como a S100B, a GFAP, a captação de glutamato, a atividade da GS e a GSH.

2.2.2. Verificar o efeito da curcumina e piperina isoladamente ou combinados sobre a sinalização inflamatória por indução com LPS, através de parâmetros como o TNF- $\alpha$ , a S100B e a GFAP.

## 3. Metodologia

### 3.1. Materiais

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB) e outros materiais para cultura de células foram adquiridos da Gibco (California, USA). Poli-L-lisina, curcumina, piperina, dimetilsulfóxido (DMSO), LPS, anticorpo anti-S100B monoclonal (SH-B1), anticorpo anti-GFAP, anti-actina, glutationa, phthaldialdehyde (OPT), o-fenilenediamina (OPD), methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) e vermelho neutro (VN) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, USA). Anti-S100B policlonal

e anti-rabbit peroxidase foram adquiridos da DAKO (São Paulo, Brasil) e GE (Little Chalfont, Reino Unido), respectivamente. [2,3-<sup>3</sup>H] Glutamato foi adquirido da Amersham International (UK). O kit ELISA para TNF- $\alpha$  foi adquirido da eBioscience (San Diego, USA), e o kit para atividade da LDH foi adquirido da Bioclin, (Belo Horizonte, Brasil).

### 3.2. Cultura de Astrócitos

As culturas primárias de astrócitos corticais foram preparadas como previamente descrito (Gottfried *et al.*, 1999). Córtices de ratos Wistar (machos e fêmeas) recém-nascidos foram dissecados e limpos de suas meninges. Após dissociação mecânica e sedimentação, o sobrenadante foi removido e centrifugado a 300 x g por 5 minutos. O *pellet* de células foi suspenso em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e as células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços previamente recobertas com poli L-lisina. Para os ensaios de imunocitoquímica, as células foram semeadas sobre lamínulas também recobertas com poli-L-lisina. Os astrócitos foram mantidos a 37°C em atmosfera 95% ar/5% CO<sub>2</sub> por aproximadamente 21 dias até atingirem confluência. Para os ensaios de imunocitoquímica, as células foram utilizadas pré-confluentes, com 10 dias de cultivo.

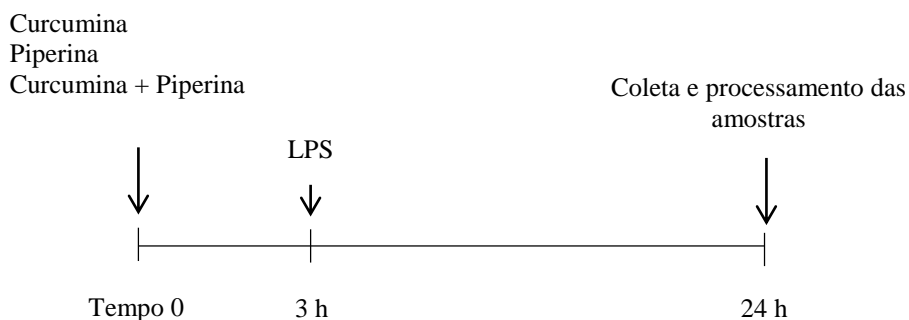
### 3.3. Delineamento Experimental

#### 3.3.1. Efeito da curcumina ou piperina sobre parâmetros astrocíticos.

Após a confluência, o meio de cultivo foi substituído por DMEM sem soro adicionado ou não de curcumina (10, 25, 50, 75 ou 100  $\mu$ M) ou piperina (10, 25, 50, 75 ou 100  $\mu$ M) durante 24 horas. A curcumina e a piperina foram diluídas em DMSO 0,1%, que foi utilizado como veículo em todos os experimentos. Com base nas análises dessa fase, uma concentração de cada um dos compostos foi escolhida para os experimentos da fase 2.

### 3.3.2. Efeito da curcumina, da piperina e da combinação das duas sobre a sinalização inflamatória induzida por LPS em astrócitos.

O meio foi substituído por DMEM sem soro adicionado ou não de curcumina e piperina isoladas ou combinadas na concentração de 50  $\mu$ M. Após 3 horas de tratamento, LPS (1 $\mu$ g/mL) foi adicionado ao meio de incubação e mantido por 24 h, resultando em um tratamento de 27 horas. O delineamento experimental da fase 2 está ilustrado abaixo (Figura 4).



**Figura 4. Delineamento Experimental.** As células foram pré-incubadas com curcumina, piperina ou com a combinação das duas por 3 h em DMEM sem SFB e, após, foi adicionado LPS por mais 24 h. Ao final, o meio de cultura foi coletado e/ou as células foram lisadas para a realização dos ensaios bioquímicos, conforme descrito em cada metodologia.

### 3.4. Redução de MTT

Trinta minutos antes do término do tempo de incubação, foi adicionado ao meio MTT 0,05 mg/mL. Em seguida, o meio de cultura foi removido e os cristais formados pela redução do MTT foram dissolvidos em DMSO. Os valores de absorbância foram medidos em dois comprimentos de onda, 560 e 650 nm e o cálculo foi realizado subtraindo o valor de absorbância lido em 650 nm do valor obtido em 560 nm (Guerra *et al.*, 2011).

### 3.5. Incorporação de vermelho neutro (VN)

Trinta minutos antes do término do tempo de incubação, foi adicionado ao meio VN 0,05 mg/mL. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato por 5 min em cada lavagem. Após, o VN internalizado pelas células foi extraído com solução de extração contendo ácido acético, etanol e água (1:50:49). Os valores de absorbância foram medidos a 560 nm (Guerra *et al.*, 2011).

### 3.6. Atividade da lactato desidrogenase extracelular (LDH)

Ao final do tempo de incubação, o meio de cultivo foi coletado e a atividade da LDH no meio extracelular foi medida utilizando um kit para avaliação da integridade celular das células, seguindo as instruções do fabricante.

### 3.7. Iodeto de propídeo

Iodeto de propídeo 0,007 mM foi adicionado ao meio 15 min antes do término do tempo de incubação. As células foram visualizadas em microscópio invertido Nikon com TE-FM acessório de fluorescência e fotografadas.

### 3.8. Imunoconteúdo e secreção de S100B

O conteúdo de S100B foi quantificado pelo método de ELISA de acordo com Leite e colaboradores (Leite *et al.*, 2008). A secreção de S100B foi avaliada em amostras de meio de incubação, assim como o conteúdo intracelular dessa proteína nos astrócitos, no lisado celular. As amostras juntamente com tampão tris foram incubados por 2 horas em uma placa pré-incubada com anti-S100B monoclonal (SH-B1). Após, IgG anti-S100B policlonal produzido em coelho foi incubado por 30 minutos e, então, um anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase foi incubado por mais 30 minutos. A reação colorimétrica com OPD foi medida em 492nm. O valor da concentração de S100B foi



calculado a partir da comparação das absorvâncias das amostras com uma curva padrão de S100B, variando de 0,002 – 1 ng/mL.

### 3.9. Imunoconteúdo de GFAP

O conteúdo de GFAP foi quantificado por ELISA como descrito anteriormente (Tramontina *et al.*, 2007), realizado inicialmente com o revestimento das microplacas com as amostras durante 24 h a 4°C. Após, foi feita a incubação com um anticorpo IgG policlonal anti-GFAP produzido em coelho durante 1 h à temperatura ambiente, seguida de outra incubação com um anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, durante 1 h, à temperatura ambiente. Em seguida, a reação colorimétrica com OPD foi medida em 492 nm. O valor de concentração de GFAP foi calculado a partir da comparação das absorvâncias das amostras com uma curva padrão de GFAP, variando de 0,1 a 10 ng GFAP.

### 3.10. Captação de glutamato

A captação de glutamato foi realizada segundo Feoli e colaboradores (Feoli *et al.*, 2006). As células foram incubadas a 37°C em solução salina equilibrada de Hanks (HBSS). O ensaio foi iniciado pela adição de 0,1 mM de L-glutamato e 0,33 µCi/mL de L-[2,3-<sup>3</sup>H] glutamato. A incubação foi parada após 7 min pela remoção do meio e lavagem das células três vezes com HBSS gelado. As células foram lisadas em uma solução 0,5 M de NaOH. Após a adição de líquido de cintilação, a radioatividade foi medida em um contador de cintilação. Os valores foram corrigidos pelo valor de proteínas totais.

### 3.11. 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). Após 15 minutos, 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 1000 x g por 15 minutos a fim de separar as proteínas precipitadas e o sobrenadante foi lido a 530 nm em espectrofotômetro. Para a curva da GS, foram pesadas quantidades padrão de  $\gamma$ -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 (Minet *et al.*, 1997).

### 3.12. Conteúdo de GSH

As células foram lisadas em tampão fosfato contendo KCl (20 mM/140 mM) e, após, foi adicionado ácido metafosfórico (concentração final de 4,6 mg/mL). O homogeneizado foi então centrifugado 1000 x g por 10 minutos. As amostras e os pontos da curva serão pipetados em microplaca de 96 poços, contendo tampão GSH (fosfato de sódio monobásico 0,1 M e EDTA 0,005 M). Após, a placa foi incubada com OPT 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 (Browne e Armstrong, 1998).

### 3.13. Secreção de Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

O meio de cultivo foi coletado e congelado a -80°C até a hora do ensaio. O TNF- $\alpha$  foi quantificado no meio extracelular através de kit comercial de ELISA, seguindo as instruções do fabricante.

## 5. Discussão

### 5.1. Efeito da curcumina e da piperina em astrócitos

O papel da alimentação na prevenção contra doenças neurodegenerativas tem se destacado nos últimos anos, através da investigação da relação entre o perfil dietético e o desenvolvimento de patologias no SNC (Businaro *et al.*, 2018). A alimentação equilibrada ainda pode ser chave na prevenção de quadros metabólicos que geram consequências no SNC, como a resistência à insulina periférica presente no diabetes e seus possíveis desfechos centrais (Mayeux e Stern, 2012). Ainda, tem sido demonstrado grande interesse em investigar o papel protetor de compostos bioativos presentes na alimentação, devido a seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (Scapagnini *et al.*, 2011).

A curcumina e a piperina são compostos promissores, com destaque à sua ação anti-inflamatória, já relatada em diversos tecidos periféricos (Aggarwal *et al.*, 2013), porém, seus efeitos no SNC ainda são pouco estudados. Uma vez que os astrócitos são conhecidos por desempenharem um importante papel no início e progressão de diversas patologias que envolvem a neuroinflamação e a curcumina e a piperina estão presentes em alimentos consumidos regularmente pela população, é importante entender se esses compostos podem modular as funções astrocíticas, mesmo em condições basais, bem como determinar concentrações seguras, que não causem efeitos tóxicos em culturas. Nesse sentido, nossos resultados indicam que apenas a concentração de 100  $\mu\text{M}$  de curcumina apresentou toxicidade celular, observada por uma diminuição da redução de MTT e incorporação de VN, bem como um aumento da liberação de LDH e marcação com iodeto de propídeo. Esse resultado corrobora resultados encontrados na literatura, nos quais a mesma concentração de curcumina foi tóxica em linhagens de astrócitos (Lavoie *et al.*, 2009; Romero-Hernández *et al.*, 2013). A piperina, no entanto, não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas, e embora

nenhum estudo tenha testado as mesmas concentrações em células do SNC, em tecidos periféricos, concentrações até 500  $\mu\text{M}$  foram consideradas seguras (Li *et al.*, 2015; Ren e Liang, 2018).

Considerando o importante papel dos astrócitos no metabolismo glutamatérgico, algumas funções astrocíticas relacionadas com o ciclo glutamato-glutamina foram avaliadas: a captação de glutamato, atividade da GS e conteúdo de GSH. A captação de glutamato foi diminuída apenas em resposta à incubação com curcumina na concentração de 75  $\mu\text{M}$ . Embora essa concentração não tenha alterado parâmetros de viabilidade celular em nossos ensaios, esse dado pode sugerir um prejuízo no metabolismo glutamatérgico e possível efeito tóxico, uma vez que uma redução da captação de glutamato poderia implicar em uma maior concentração extracelular desse neurotransmissor, que pode levar à toxicidade (Sofroniew e Vinters, 2010).

O glutamato tem dois destinos importantes, após ser captado pelos astrócitos: a síntese de glutamina, através da atividade da enzima GS e a síntese de GSH. A curcumina e a piperina não foram capazes de alterar a atividade da GS, por outro lado, o conteúdo de GSH foi aumentado de forma expressiva na concentração de 50  $\mu\text{M}$  de curcumina. Nós acreditamos que possivelmente esse aumento pode estar relacionado a um aumento na síntese do tripeptídeo, visto que trabalhos de Lavoie e colaboradores encontraram um aumento na expressão gênica da GCLM, subunidade catalítica da GCL, bem como da GSS em astrócitos incubados com curcumina na concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Além disso, a incubação com 50  $\mu\text{M}$  de curcumina gerou aumento nos níveis de RNA mensageiros das duas subunidades da GCL, a GCLM e a GCLC. Corroborando o aumento na expressão gênica de intermediários da síntese de GSH, ainda foi encontrado um aumento importante na atividade da enzima GCL em culturas de astrócitos em condições basais (Lavoie *et al.*, 2009). Nosso resultado de aumento do conteúdo de GSH induzido por curcumina pode ser importante também na proteção de outras células do SNC,

principalmente os neurônios. Após sua síntese no astrócito, a GSH é enviada para o espaço extracelular, onde serve como precursora da síntese neuronal de GSH. De fato, já foi descrito que o tratamento com curcumina na concentração de 30  $\mu\text{M}$  aumenta também o efluxo de GSH nos astrócitos, tanto em condições basais quanto em uma condição estimulada com a depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Stridh *et al.*, 2010).

Com relação às proteínas marcadoras de astrócitos, nossos dados mostraram uma alteração na secreção de S100B e no conteúdo de GFAP de células incubadas com 50  $\mu\text{M}$  de curcumina. A S100B é uma proteína que, dependendo de sua concentração, pode exercer efeitos tróficos ou tóxicos, sendo inclusive proposta como biomarcadora de doenças neurodegenerativas (Barateiro *et al.*, 2016). Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, uma diminuição na secreção de S100B em astrócitos incubados com curcumina, o que pode indicar uma adaptação celular com intuito de prevenir respostas exacerbadas frente a insultos futuros. Encontramos um aumento no conteúdo de GFAP nas concentrações de 50 e 75  $\mu\text{M}$  de curcumina, resultado que, em condições basais, não tinha sido observado. O aumento da GFAP é geralmente considerado um efeito deletério, relacionado ao fenômeno de astrogliose, que acontece na resposta à insultos e tem como uma das alterações a hipertrofia celular, resultando em uma regulação positiva no conteúdo de GFAP (Sofroniew, 2014). Entretanto, o aumento de GFAP também pode ser resultado de um aumento no trofismo celular, metabolismo astrogliar e síntese proteica. O aumento de GFAP também é observado em astrócitos em resposta ao exercício físico, que tem um importante papel protetor contra doenças neurodegenerativas, portanto, um efeito benéfico (Saur *et al.*, 2014). É importante lembrar que o aumento no conteúdo de GFAP observado em nosso trabalho foi acompanhado de um aumento no conteúdo de GSH na mesma concentração de curcumina, parâmetro que indica melhora na proteção antioxidante celular.

Após a conclusão dos experimentos com a curva de curcumina e piperina, observamos que a curcumina na concentração de 50  $\mu$ M foi capaz de aumentar o conteúdo de GSH, diminuir a secreção de S100B e aumentar o conteúdo de GFAP. Dessa forma, essa foi a concentração escolhida para os experimentos de proteção frente a um estímulo inflamatório. A piperina não teve efeitos *per se* nos parâmetros avaliados nas concentrações testadas em condições basais. Então, com o intuito de verificar seus efeitos em condições inflamatórias ou ainda em combinação com a curcumina, utilizamos a mesma concentração escolhida para a curcumina.

## 5.2. Efeito da curcumina e piperina em condições inflamatórias

Muitas estratégias têm sido propostas com o objetivo de atenuar a neuroinflamação observada em diversas patologias, como o uso de medicamentos anti-inflamatórios já utilizados para as doenças sistêmicas. Entretanto, os efeitos proporcionados por esses medicamentos parecem não se manter à longo prazo no SNC, além da possibilidade em gerar efeitos colaterais devido a sua toxicidade (Imbimbo *et al.*, 2010). Por esse motivo, há interesse em investigar compostos naturais que possam exercer efeitos protetores e seguros, não apenas para utilizá-los na dieta, bem como a fim de desenvolver novos fármacos a partir dessas moléculas já conhecidas.

Para compreender os possíveis efeitos protetores da curcumina e piperina na resposta inflamatória induzida por LPS, iniciamos pela medida de TNF- $\alpha$ . O LPS é um componente de parede celular bacteriana, bem estabelecido como indutor da resposta inflamatória (Hauss-Wegrzyniak *et al.*, 1998). Em animais, a administração de LPS via intracerebroventricular causa alterações histológicas e anatômicas na estrutura cerebral, além de aumentar a secreção de citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$  (Hauss-Wegrzyniak *et al.*, 1998; Guerra *et al.*, 2011). Ainda *in vivo*, modelos de inflamação periférica com LPS demonstram uma comunicação entre o sistema imune periférico e central, visto que alterações cerebrais são encontradas quando LPS

foi administrado via intraperitoneal, aumentando a expressão gênica de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e NF- $\kappa$ B (Qin *et al.*, 2007). Estudos de nosso grupo já mostraram que o LPS em ensaios *in vitro* ativa a liberação de mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  em astrócitos a partir de 1h de incubação, em concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10 e 30  $\mu$ g/mL (Guerra *et al.*, 2011). Em nosso estudo, observamos um aumento expressivo na secreção de TNF- $\alpha$  após a incubação com LPS na concentração de 1  $\mu$ g/mL, corroborando os resultados já mostrados anteriormente. A curcumina e a piperina foram capazes de reverter à níveis basais o aumento de TNF- $\alpha$  gerado pelo LPS, mostrando uma importante ação anti-inflamatória. Tanto isolados quanto combinados, os compostos exerceram efeito protetor na cultura de astrócitos. É importante ressaltar que o aumento da secreção de TNF- $\alpha$  foi revertido aos valores basais.

Os efeitos *in vivo* da curcumina em modelos de neuroinflamação já tem sido relatados, visto que a mesma foi capaz de atenuar a neuroinflamação aguda e, à longo prazo, atenuar o déficit comportamental causado pelo modelo com LPS (Sorrenti *et al.*, 2018). Outro estudo observou a potencialização dos efeitos anti-inflamatórios da curcumina pela piperina, uma vez que a combinação de ambos compostos diminuiu significativamente a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em relação ao tratamento com os compostos isolados, também em um modelo de neuroinflamação induzida por LPS (Jangra *et al.*, 2016). *In vitro*, a cascata inflamatória gerada pelo LPS também foi atenuada pela incubação com curcumina, efeito demonstrado através da diminuição da secreção de IL-6 em astrócitos e diminuição da expressão gênica de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  em neurônios (Seyedzadeh *et al.*, 2014).

Nossos dados mostram que a secreção de S100B foi diminuída pelo LPS, alteração que já havia sido relatada em trabalhos anteriores (Guerra *et al.*, 2011). Nessa situação, a curcumina e a piperina não foram capazes de reverter a alteração gerada pelo LPS. É importante ressaltar que curcumina, quando incubada em condições basais, já havia diminuído a secreção de S100B,

efeito que foi mantido na mesma magnitude na presença do LPS. A diminuição da secreção de S100B pelo LPS e pela curcumina possivelmente indica uma resposta de adaptação celular ao ambiente inflamatório. A S100B já foi descrita como uma molécula de sinalização importante, devido ao seu papel dual entre neurotrofismo e neurotoxicidade (Donato *et al.*, 2009). Quando liberada de forma aguda, a ligação da S100B com o receptor RAGE estimula a expressão de COX-2 e a ativação da microglia, contribuindo para a progressão da resposta exacerbada ao dano no SNC (Bianchi *et al.*, 2007; Bianchi *et al.*, 2011). Portanto, a ação da curcumina na sinalização inflamatória pode ser uma forma de evitar a resposta celular exacerbada à longo prazo, diminuindo a secreção de TNF- $\alpha$  e S100B, fatores que podem vir a contribuir com uma resposta patológica em altas concentrações. Uma vez que em altas concentrações a S100B pode exercer efeitos tóxicos e encontra-se aumentada em diversas patologias, ela pode ser considerada por alguns autores como uma citocina pró-inflamatória (Liu *et al.*, 2005). Entretanto, nosso trabalho reforça que, apenas a sua concentração no meio extracelular não pode ser considerada como um marcador inflamatório isoladamente, uma vez que ela mostrou o mesmo perfil de redução de secreção quando os astrócitos foram estimulados por LPS, um estímulo inflamatório, ou curcumina, um estímulo anti-inflamatório.

Por outro lado, o aumento no conteúdo de GFAP causado pelo LPS foi revertido pela piperina, mas não pela curcumina. Essa alteração causada pelo LPS já havia sido mostrada em culturas de astrócitos, corroborando nosso dado (Guerra *et al.*, 2011). A piperina, apesar de não ter exercido efeitos *per se* no conteúdo de GFAP, diminuiu o aumento causado pelo LPS, demonstrando uma ação diferente quando na presença de sinalização inflamatória. Apesar de esse dado ser o primeiro em um modelo de inflamação *in vitro*, em um modelo *in vivo* de epilepsia, a piperina já havia diminuído a marcação de astrócitos GFAP-positivos no giro denteado do hipocampo (Anissian *et al.*, 2018). Esse dado sugere uma ação protetora da



piperina, em conjunto com a reversão do aumento da secreção de TNF- $\alpha$  induzido por LPS observado em nosso estudo.

A curcumina, no entanto, não foi capaz de reverter o aumento de GFAP induzido por LPS. É importante ressaltar que a curcumina em condições basais já havia aumentado o conteúdo de GFAP nas culturas de astrócitos. Entretanto, seu efeito não é aditivo ao efeito do LPS em uma situação inflamatória. Esse dado traz um papel importante da curcumina, mostrando uma mudança de efeito conforme o ambiente no qual ela é exposta. Essa ação também é evidenciada na incubação com curcumina e piperina combinadas, na qual a ação da piperina prevaleceu à ação da curcumina, mantendo a reversão do aumento do conteúdo de GFAP causado pelo LPS. Dessa forma, a piperina mostrou uma ação protetora, enquanto a curcumina, apesar de não reverter a resposta causada pelo LPS, não comprometeu a ação da piperina.

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem uma importante ação da curcumina e piperina na modulação de parâmetros astrogliais, principalmente em resposta à um estímulo inflamatório. A ação da curcumina parece ser mediada por diversos fatores envolvidos na sinalização inflamatória, portanto, não parece existir um caminho único para compreender sua ação. Diversos alvos moleculares já foram sugeridos, como a ação através dos fatores de transcrição NF $\kappa$ B e Nrf2 (Sahin *et al.*, 2016). Porém, a forma com que a curcumina é reconhecida e internalizada nas células ainda é questionada. A ligação da curcumina à receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) é uma das possibilidades, visto que os efeitos protetores da curcumina em um modelo *in vivo* de inflamação são importantemente diminuídos pela incubação com antagonistas de PPAR $\gamma$  (Wang, H. M. *et al.*, 2010). Outro receptor possivelmente envolvido na ação da curcumina é o receptor de tropomiosina cinase B (TrkB), visto que os efeitos protetores exercidos por ela na viabilidade celular de neurônios em condições basais foi bloqueada por um inibidor de TrkB (Wang, R. *et*

*al.*, 2010). É importante frisar que o receptor TrkB está envolvido na sinalização do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), essencial nos processos de neurogênese e plasticidade sináptica (Leal *et al.*, 2017). Ainda, o sistema endocanabinóide, especificamente o receptor CB1, também pode ser mediador da sinalização ativada pela curcumina (Hassanzadeh e Hassanzadeh, 2012). O envolvimento de receptores na ação da piperina ainda é pouco investigado, principalmente em células do SNC. Entretanto, o receptor PPAR $\gamma$  parece estar envolvido, como evidenciado em um modelo *in vivo* de fibrose cardíaca (Ma *et al.*, 2017).

De uma forma geral, mais estudos precisam ser realizados para investigar receptores envolvidos na ação da curcumina e piperina, principalmente no que diz respeito à S100B e à GFAP. Ainda, a avaliação dos efeitos de um tratamento crônico com os compostos pode ser importante para determinar o papel da curcumina na secreção de S100B e conteúdo de GFAP, principalmente em resposta à inflamação induzida pelo LPS.

## 6. Conclusão

Em nosso trabalho, observamos que, em condições basais, a curcumina foi capaz de alterar parâmetros astrocíticos relacionados ao metabolismo glutamatérgico, aumentando de forma expressiva o conteúdo de GSH. Ainda em condições basais, observamos alterações em proteínas marcadoras de astrócitos, visto que a curcumina diminuiu a secreção de S100B e aumentou o conteúdo de GFAP. Esses resultados mostram significativa melhora na proteção antioxidante cerebral e possível efeito trófico da curcumina sob os astrócitos. A piperina, por sua vez, não alterou os parâmetros avaliados em condições basais.

Na sinalização inflamatória gerada por LPS, a curcumina e a piperina tiveram efeitos importantes, diminuindo a secreção de TNF- $\alpha$  a níveis basais. A piperina, que em condições basais não havia alterado os parâmetros analisados, em condições inflamatórias reverteu o aumento de GFAP também a níveis basais.

Dessa forma, a curcumina e a piperina mostraram efeitos complementares importantes. Embora seus efeitos não tenham sido sinérgicos, ambos compostos se completam pelo fato de que a curcumina aumentou GSH, a piperina reverteu o aumento de GFAP em condições inflamatórias, e ambas reverteram o aumento da secreção de TNF- $\alpha$  a níveis basais em condições inflamatórias. Portanto, a utilização dos dois compostos juntos, em nosso estudo, resultou em efeitos biológicos relevantes e promissores para a proteção anti-inflamatória no SNC.

#### 7. Perspectivas

- ✓ Avaliar o imunconteúdo de TLR4, RAGE e COX-2 por eletroforese e imunodeteção na incubação de curcumina e/ou piperina em condições inflamatórias;
- ✓ Avaliar a translocação de NF $\kappa$ B ao núcleo através de imunocitoquímica na incubação de curcumina e/ou piperina em condições inflamatórias;
- ✓ Tratamento *in vivo* com injeção intraperitoneal ou intracerebroventricular de LPS em ratos para verificar parâmetros inflamatórios centrais e periféricos, bem como o papel da curcumina e/ou piperina na neuroinflamação.

#### 8. Apoio financeiro

Esse trabalho foi realizado com apoio financeiro da CAPES, CNPq e Fapergs.

## 9. 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.

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.

ANISSIAN, D. et al. Piperine-loaded chitosan-STPP nanoparticles reduce neuronal loss and astrocytes activation in chemical kindling model of epilepsy. **Int J Biol Macromol**, v. 107, n. Pt A, p. 973-983, Feb 2018. ISSN 1879-0003.

BANJI, D. et al. Piperine and curcumin exhibit synergism in attenuating D-galactose induced senescence in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 703, n. 1-3, p. 91-9, Mar 2013. ISSN 1879-0712.

BARATEIRO, A. et al. S100B as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in Multiple Sclerosis. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 6, p. 3976-3991, 08 2016. ISSN 1559-1182.

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.

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.

BIANCHI, R. et al. S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. **J Leukoc Biol**, v. 81, n. 1, p. 108-18, Jan 2007. ISSN 0741-5400.

BIANCHI, R. et al. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. **J Biol Chem**, v. 286, n. 9, p. 7214-26, Mar 2011. ISSN 1083-351X.

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.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods Mol Biol**, v. 108, p. 347-52, 1998. ISSN 1064-3745.

BUSINARO, R. et al. Modulation of Inflammation as a Way of Delaying Alzheimer's Disease Progression: The Diet's Role. **Curr Alzheimer Res**, v. 15, n. 4, p. 363-380, 02 2018. ISSN 1875-5828.

CHAINANI-WU, N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). **J Altern Complement Med**, v. 9, n. 1, p. 161-8, Feb 2003. ISSN 1075-5535.

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.

CHEN, G. et al. Curcumin Attenuates gp120-Induced Microglial Inflammation by Inhibiting Autophagy via the PI3K Pathway. **Cell Mol Neurobiol**, v. 38, n. 8, p. 1465-1477, Nov 2018. ISSN 1573-6830.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **J Neurochem**, v. 139 Suppl 2, p. 136-153, 10 2016. ISSN 1471-4159.

DONATO, R. et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, n. 6, p. 1008-22, Jun 2009. ISSN 0006-3002.

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**, v. 43, n. 9, p. 1837-46, Sep 2008. ISSN 0223-5234.

EIGENMANN, D. E. et al. In vitro blood-brain barrier permeability predictions for GABAA receptor modulating piperine analogs. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 103, p. 118-26, Jun 2016. ISSN 1873-3441.

FEOLI, A. M. et al. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. **J Nutr**, v. 136, n. 9, p. 2357-61, Sep 2006. ISSN 0022-3166.

FU, M.; SUN, Z. H.; ZUO, H. C. Neuroprotective effect of piperine on primarily cultured hippocampal neurons. **Biol Pharm Bull**, v. 33, n. 4, p. 598-603, 2010. ISSN 1347-5215.

GAO, X. et al. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro. **Biochem Pharmacol**, v. 68, n. 1, p. 51-61, Jul 2004. ISSN 0006-2952.

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.

GOTTFRIED, C. et al. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). **Brain Res**, v. 833, n. 2, p. 142-9, Jul 1999. ISSN 0006-8993.

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.

GUO, J. et al. Piperine ameliorates SCA17 neuropathology by reducing ER stress. **Mol Neurodegener**, v. 13, n. 1, p. 4, 01 2018. ISSN 1750-1326.

HASSANZADEH, P.; HASSANZADEH, A. The CB<sub>1</sub> receptor-mediated endocannabinoid signaling and NGF: the novel targets of curcumin. **Neurochem Res**, v. 37, n. 5, p. 1112-20, May 2012. ISSN 1573-6903.

HAUSS-WEGRZYNIAK, B. et al. Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study. **Brain Res**, v. 794, n. 2, p. 211-24, Jun 1998. ISSN 0006-8993.

IMBIMBO, B. P.; SOLFRIZZI, V.; PANZA, F. Are NSAIDs useful to treat Alzheimer's disease or mild cognitive impairment? **Front Aging Neurosci**, v. 2, 2010. ISSN 1663-4365.

JAIN, S. K. et al. Curcumin supplementation lowers TNF-alpha, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion in high glucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF-alpha, IL-6, MCP-1, glucose, and glycosylated hemoglobin in diabetic rats. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 2, p. 241-9, Feb 2009. ISSN 1557-7716.

JANGRA, A. et al. Piperine Augments the Protective Effect of Curcumin Against Lipopolysaccharide-Induced Neurobehavioral and Neurochemical Deficits in Mice. **Inflammation**, v. 39, n. 3, p. 1025-38, Jun 2016. ISSN 1573-2576.

KAUR, H. et al. Piperine potentiates curcumin-mediated repression of mTORC1 signaling in human intestinal epithelial cells: implications for the inhibition of protein synthesis and TNF $\alpha$  signaling. **J Nutr Biochem**, v. 57, p. 276-286, Jul 2018. ISSN 1873-4847.

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.

LEAL, G.; BRAMHAM, C. R.; DUARTE, C. B. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. **Vitam Horm**, v. 104, p. 153-195, 2017. ISSN 0083-6729.

LEITE, M. C. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **J Neurosci Methods**, v. 169, n. 1, p. 93-9, Mar 2008. ISSN 0165-0270.

LI, Y. et al. Piperine mediates LPS induced inflammatory and catabolic effects in rat intervertebral disc. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 6, p. 6203-13, 2015. ISSN 1936-2625.

LIANG, G. et al. Inhibition of LPS-induced production of inflammatory factors in the macrophages by mono-carbonyl analogues of curcumin. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 9B, p. 3370-9, Sep 2009. ISSN 1582-4934.

LIU, L. et al. S100B-induced microglial and neuronal IL-1 expression is mediated by cell type-specific transcription factors. **J Neurochem**, v. 92, n. 3, p. 546-53, Feb 2005. ISSN 0022-3042.

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.

LU, Y. et al. Piperine Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury via Modulating NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 303-8, Feb 2016. ISSN 1573-2576.

MA, Z. G. et al. Piperine Attenuates Pathological Cardiac Fibrosis Via PPAR- $\gamma$ /AKT Pathways. **EBioMedicine**, v. 18, p. 179-187, Apr 2017. ISSN 2352-3964.

MAGISTRETTI, P. J. et al. Regulation of astrocyte energy metabolism by neurotransmitters. **Ren Physiol Biochem**, v. 17, n. 3-4, p. 168-71, 1994 May-Aug 1994. ISSN 1011-6524.

MAGISTRETTI, P. J. et al. Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells. **Dev Neurosci**, v. 15, n. 3-5, p. 306-12, 1993. ISSN 0378-5866.

MARTINS, C. A. et al. Curcumin in Combination with Piperine Suppresses Osteoclastogenesis In Vitro. **J Endod**, v. 41, n. 10, p. 1638-45, Oct 2015. ISSN 1878-3554.

MAYEUX, R.; STERN, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 8, Aug 2012. ISSN 2157-1422.

MILLER, A. A.; SPENCER, S. J. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. **Brain Behav Immun**, v. 42, p. 10-21, Nov 2014. ISSN 1090-2139.

MINET, R. et al. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. **Clin Chim Acta**, v. 268, n. 1-2, p. 121-32, Dec 1997. ISSN 0009-8981.

MIRZAEI, H. et al. Phytosomal curcumin: A review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies. **Biomed Pharmacother**, v. 85, p. 102-112, Jan 2017. ISSN 1950-6007.

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.

NG, T. P. et al. Curry consumption and cognitive function in the elderly. **Am J Epidemiol**, v. 164, n. 9, p. 898-906, Nov 2006. ISSN 0002-9262.

PARPURA, V. et al. Glial cells in (patho)physiology. **J Neurochem**, v. 121, n. 1, p. 4-27, Apr 2012. ISSN 1471-4159.

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.

QIN, L. et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia**, v. 55, n. 5, p. 453-62, Apr 2007. ISSN 0894-1491.

RANSOM, B. R.; RANSOM, C. B. Astrocytes: multitalented stars of the central nervous system. **Methods Mol Biol**, v. 814, p. 3-7, 2012. ISSN 1940-6029.



REN, C.; LIANG, Z. Piperine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury by down-regulating microRNA-127 in murine chondrogenic ATDC5 cells. **Biomed Pharmacother**, v. 103, p. 947-954, Jul 2018. ISSN 1950-6007.

ROMERO-HERNÁNDEZ, M. A. et al. Toxic effects induced by curcumin in human astrocytoma cell lines. **Toxicol Mech Methods**, v. 23, n. 9, p. 650-9, Nov 2013. ISSN 1537-6524.

SAHIN, K. et al. Curcumin prevents muscle damage by regulating NF- $\kappa$ B and Nrf2 pathways and improves performance: an in vivo model. **J Inflamm Res**, v. 9, p. 147-54, 2016. ISSN 1178-7031.

SARADA, S. et al. Role of oxidative stress and NF $\kappa$ B in hypoxia-induced pulmonary edema. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 233, n. 9, p. 1088-98, Sep 2008. ISSN 1535-3702.

SAUR, L. et al. Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. **Brain Struct Funct**, v. 219, n. 1, p. 293-302, Jan 2014. ISSN 1863-2661.

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.

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.

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.

SOFRONIEW, M. V. Astrogliosis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 2, p. a020420, Nov 2014. ISSN 1943-0264.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 1, p. 7-35, Jan 2010. ISSN 1432-0533.

SORRENTI, V. et al. Curcumin Prevents Acute Neuroinflammation and Long-Term Memory Impairment Induced by Systemic Lipopolysaccharide in Mice. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 183, 2018. ISSN 1663-9812.

STRIDH, M. H. et al. Enhanced glutathione efflux from astrocytes in culture by low extracellular Ca<sup>2+</sup> and curcumin. **Neurochem Res**, v. 35, n. 8, p. 1231-8, Aug 2010. ISSN 1573-6903.

TRAMONTINA, F. et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **J Neurosci Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 282-6, May 2007. ISSN 0165-0270.

VARATHARAJ, A.; GALEA, I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. **Brain Behav Immun**, v. 60, p. 1-12, Feb 2017. ISSN 1090-2139.

WANG, D. D.; BORDEY, A. The astrocyte odyssey. **Prog Neurobiol**, v. 86, n. 4, p. 342-67, Dec 2008. ISSN 0301-0082.

WANG, H. M. et al. PPAR $\gamma$  agonist curcumin reduces the amyloid-beta-stimulated inflammatory responses in primary astrocytes. **J Alzheimers Dis**, v. 20, n. 4, p. 1189-99, 2010. ISSN 1875-8908.

WANG, J. et al. Connection between Systemic Inflammation and Neuroinflammation Underlies Neuroprotective Mechanism of Several Phytochemicals in Neurodegenerative Diseases. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 1972714, 2018. ISSN 1942-0994.

WANG, R. et al. Curcumin produces neuroprotective effects via activating brain-derived neurotrophic factor/TrkB-dependent MAPK and PI-3K cascades in rodent cortical neurons. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 1, p. 147-53, Feb 2010. ISSN 1878-4216.

XIE, Y. L. et al. Curcumin attenuates lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury by activating Nrf2 nuclear translocation and inhibiting NF- $\kappa$ B activation. **Biomed Pharmacother**, v. 91, p. 70-77, Jul 2017. ISSN 1950-6007.

YANG, F. et al. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. **J Biol Chem**, v. 280, n. 7, p. 5892-901, Feb 2005. ISSN 0021-9258.

YOUN, H. S. et al. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 1, p. 62-9, Jun 2006. ISSN 0006-2952.

ZHAI, W. J. et al. Piperine Plays an Anti-Inflammatory Role in Staphylococcus aureus Endometritis by Inhibiting Activation of NF- $\kappa$ B and MAPK Pathways in Mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2016, p. 8597208, 2016. ISSN 1741-427X.

ZHANG, L. et al. Demethoxycurcumin, a natural derivative of curcumin attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF-kappaB signaling pathways in N9 microglia induced by lipopolysaccharide. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 3, p. 331-8, Mar 2010. ISSN 1878-1705.

ZHENG, J. et al. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. **Nutrients**, v. 8, n. 8, Aug 2016. ISSN 2072-6643.