

## EFEITO DA CURCUMINA LIVRE E NANOENCAPSULADA EM BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIAMNÉSICA EM UM MODELO EM CAMUNDONGOS

ADRIZE MENDES RIVAROLI<sup>1</sup>; KARLINE DA COSTA RODRIGUES<sup>2</sup>; MELIZA DA CONCEIÇÃO OLIVEIRA<sup>3</sup>; MANOEL RODRIGUES DA SILVA NETO<sup>4</sup>; SANDRA ELISA HASS<sup>5</sup>; CRISTIANE LUCHESE<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – *rivaroliadrize@gmail.com*

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – *line.karline@hotmail.com*;

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – *melizacoliveira@hotmail.com*;

<sup>4</sup>Universidade Federal do Pampa – *manoelrodrigues.aluno@unipampa.edu.br*;

<sup>5</sup>Universidade Federal do Pampa – *sandra.haas@gmail.com*;

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – *cristiane\_luchese@yahoo.com.br* (orientadora)

### 1. INTRODUÇÃO

A memória pode ser definida como um processo cognitivo que envolve a capacidade do indivíduo de adquirir, consolidar, armazenar e recuperar informações em resposta a estímulos do ambiente em que se encontra (AID, 2019). É conhecido que, em doenças neurodegenerativas (DN), ocorrem processos de declínios cognitivos, onde há uma disfunção sináptica que impede o processamento da memória adequadamente, ocasionando uma síndrome neurológica denominada demência. Assim dentre as DN, a Doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência e possui caráter irreversível e progressivo (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019).

Atualmente, a compreensão completa da fisiopatologia da DA ainda não foi alcançada, mas se tem conhecimento que os principais marcadores da patologia podem ser: depósito de proteína  $\beta$ -amiloide no cérebro, hiperfosforilação da proteína Tau, formação de emaranhados neurofibriliares, aumento do estresse oxidativo, neuroinflamação e perda neuronal (CORREIA; PERRY; MOREIRA, 2016). O processo inflamatório que está envolvido no desenvolvimento da DA tende a ser persistente e excessivo no cérebro, o que contribui para a evolução da neurodegeneração (LENG; EDISON, 2020). Tais processos neuroinflamatórios ocorrem através da ativação da micrógia, que libera citocinas que causam inflamação, como as interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF) (CAI, 2014).

Os tratamentos atuais para a DA demonstram eficácia apenas na sintomatologia e os efeitos colaterais diminuem a adesão a estes tratamentos a longo prazo. Além disso, eles podem não ser eficazes em casos de pacientes com outras condições médicas simultâneas (Alzheimer's Association, 2019). Portanto, a busca por novas opções terapêuticas para disfunções neurocognitivas se mostra extremamente vantajosa.

A Curcuma é um antioxidante derivado de plantas com funções biológicas diversas. Os benefícios neurológicos gerados pelo uso da Curcuma são aplicáveis às doenças ND. Nesse contexto, a Curcuma tem demonstrado ser capaz de diminuir níveis de moléculas inflamatórias, como interleucina (IL)-1b, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF). Entretanto a Curcuma possui baixa biodisponibilidade, que está relacionada à sua baixa solubilidade em água, isso limita sua absorção pelo trato gastrointestinal e resulta em uma alta taxa de depuração sistêmica (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009; TSAI et al., 2011).

Uma nova estratégia para superar as limitações da Curcuma livre, pode ser a aplicação da nanotecnologia, que pode melhorar, por exemplo, a permeabilidade

da molécula através da barreira sangue-cérebro (BÁRBARA et al., 2017). Com isto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com Cur livre e nanoencapsulada em modelo de amnésia induzido por escopolamina (ESC) em camundongos. Para analisar o comportamento, foi realizado o teste reconhecimento de objeto, o qual avalia a memória temporal, bem como foi analisada a ação anti-inflamatória nos tecidos cerebrais, mais precisamente córtex e hipocampo.

## 2. METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA 038773/2021-50). Para realização deste estudo, foram utilizados camundongos machos adultos da raça Swiss, com 60 dias de idade e um peso variando entre 25-35 g, obtido do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Neste estudo, foi avaliado o efeito antiamnésico e anti-inflamatório da Cur, tanto na forma livre como nanoencapsulada (Nc), usando um modelo de indução com ESC o qual se baseia em estudos anteriores (CHEON et al., 2021). Além disso, foram desenvolvidos dois protocolos de tratamento. No Protocolo 1, os animais foram tratados diariamente, enquanto no Protocolo 2, os animais foram tratados em dias alternados (dia sim, dia não).

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (com 8 animais em cada grupo) para ambos os protocolos. No Grupo I (controle) e Grupo V (ESC), os animais receberam uma solução de tween 2% (10 ml/kg) por via intragástrica (i.g). No Grupo II, os animais foram tratados com as Nc de Curcumina PCL (Nc Cur PCL) (10 mg/kg, ig), enquanto no Grupo III, foram tratados com Nc de Curcumina EUD (Nc Cur EUD) (10 mg/kg, ig). O Grupo IV foi tratado com Curcumina livre (Cur livre) (10 mg/kg, ig). Trinta minutos após os tratamentos, os Grupos II, III, IV e V foram induzidos com ESC (0,4 mg/kg, intraperitonealmente - ip), enquanto o Grupo I recebeu uma solução salina a 0,9% (5 ml/kg, ip), veículo de diluição da ESC.

Após trinta minutos da indução, nos dias 6 e 7 do protocolo, os animais foram submetidos ao teste comportamental de reconhecimento do objeto. O teste de reconhecimento do objeto é usado para avaliar a memória temporal e de localização em animais, sendo dividido em quatro etapas. Primeiramente, os animais foram submetidos ao período de habituação por cinco minutos, durante a qual os animais são ambientados em um aparato de campo aberto. Após, é realizado treino com dois objetos idênticos, onde o comportamento de exploração de cada objeto é registrado, por cinco minutos. Uma hora e meia após o treino, um dos objetos é substituído por um novo objeto de outro formato, e o mesmo procedimento é realizado. Depois de 24 horas do período de treino, é feita outra troca de objeto, e a avaliação do comportamento exploratório é repetido.

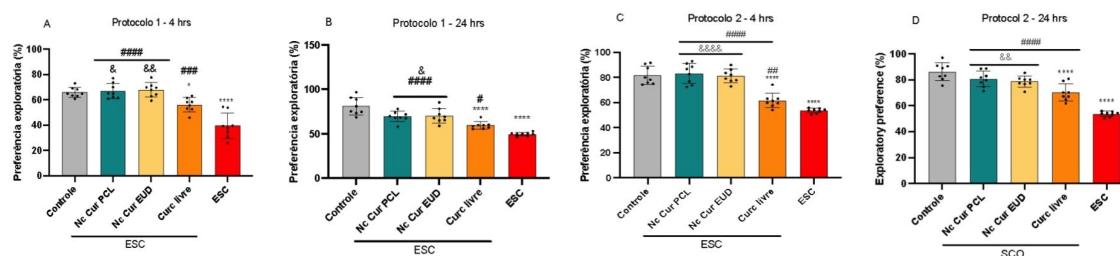
Ao término do protocolo experimental, os animais foram anestesiados, tiveram o sangue coletado e foram eutanasiados com uma overdose de isoflurano. As estruturas cerebrais, córtex cerebral e hipocampo, foram removidos para análise de biomarcadores citocinas inflamatórias.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 é demonstrado o efeito dos tratamentos no modelo induzido por ESC no reconhecimento do objeto. No primeiro protocolo (tratamento diário), os camundongos induzidos com ESC tiveram uma diminuição na preferência

exploratória do novo objeto na memória de curto prazo (MCP) (Figuras 1A e 1C, respectivamente) e na memória de longo prazo (MLP) (Figuras 1B e 1D, respectivamente). Por sua vez, os camundongos tratados com Nc Cur EUD e Nc Cur PCL obtiveram efeitos mais proeminentes na MCP e MLP em ambos os protocolos experimentais, quando comparados ao grupo Cur livre (Figuras 1A e 1C). Desta forma, foi possível verificar que a Nc Cur pareceu atenuar o declínio cognitivo do tipo amnésico de maneira mais significativa, não descartando o efeito da Cur livre.

Os tratamentos utilizados demonstraram um efeito benéfico significativo no prejuízo da memória causada pelo modelo induzido por ESC na tarefa de memória de reconhecimento de objetos. É importante ressaltar que quando os tratamentos foram realizados em dias alternados foi possível observar que o sistema Nc Cur-EUD teve efeito mais proeminente em alguns aspectos comportamentais quando comparados com Nc Cur-PCL e Cur livre.



**Figura 1.** Ilustração do efeito dos tratamentos nas tarefas de reconhecimento de objetos. No primeiro protocolo (1A), memória de curto prazo- 4h após o treinamento. (1B) memória de longo prazo - 24h após o treinamento. No segundo protocolo (1C) memória de curto prazo - 4h após o treinamento. (1D) memória de longo prazo - 24h após o treinamento. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo. Os dados são relatados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo. (\*\*\*\*) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo controle; (##) denota  $p < 0,01$ ; (##&) denota  $p < 0,001$  e (####) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo ESC; (&) denota  $p < 0,05$ ; (&&) denota  $p < 0,01$ ; (&&&) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo Nc PCL Cur (análise de variância de uma via/teste de Tukey).

Para realização da análise *ex vivo*, foi utilizado o protocolo de tratamento em dias alternados. A figura 2 demonstrou os efeitos do segundo protocolo sobre as mudanças de genes inflamatórios na análise de sequenciamento de RNA pelos níveis de pró citocinas inflamatórias em estruturas cerebrais de camundongos. A indução por ESC, como também evidenciado por RAHIMZADEGAN e SOODI (2018), aumentou o nível de citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 em córtices cerebrais (Figura 2A e 2B).

A neuroinflamação ocorre em associação as disfunções neurocognitivas, como a perda de memória, através do aumento da liberação de citocinas inflamatórias tais como IL-6 e TNF (CAI, 2014), levando ao dano neuronal e liberação de neurotransmissores. Neste sentido, através dos resultados, observou-se que os tratamentos, em especial Nc Cur EUD, diminuíram a expressão de citocinas IL-6 e TNF. Desta forma, pode-se sugerir que uma das vias de ação dos tratamentos propostos possa envolver de citocinas pró-inflamatórias, como demonstrado neste trabalho.

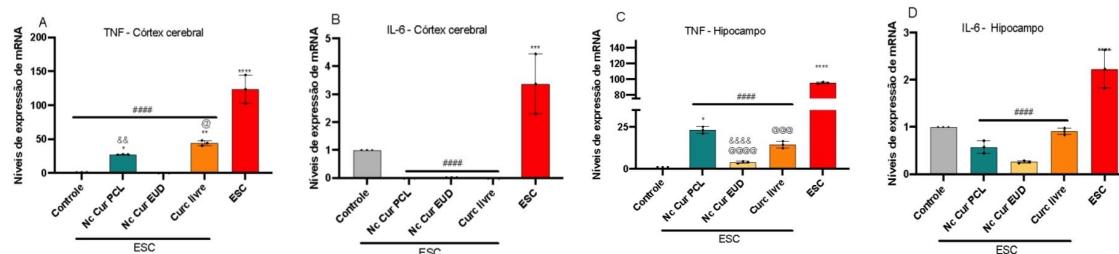


Figura 2. Os tratamentos tiveram um efeito sintomático benéfico no aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no cérebro. No segundo protocolo, TNF (Figura 2A para os córtices cerebrais e 2C para os hipocampos), IL-6 (Figura 2B para os córtices cerebrais e 2D para os hipocampos). Os valores de citocinas são expressos no nível de expressão gênica. Os dados são relatados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) representativo de 8 animais por grupo. (\*) denota  $p < 0,05$ , (\*\*) denota  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo controle; (#####) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo ESC; (&&) denota  $p < 0,01$  e (&&&) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo PCL Cur; (@@@) denota  $p < 0,001$  e (@@@@) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo Cur livre (análise unidirecional de variância/teste de Tukey para o teste de sondagem).

#### 4. CONCLUSÕES

Em conclusão, este estudo demonstrou que os sistemas de NC Cur PCL e EUD podem gerar benefícios, quando comparados a Cur livre, uma vez que o tratamento em dias alternados diminuiria a frequência de administrações, diminuindo assim a não adesão ao tratamento. Além disso, o polímero EUD demonstrou efeitos notáveis em comparação com outros grupos de tratamento na atenuação do processo de neuroinflamação. No entanto, são necessárias pesquisas mais aprofundadas para entender o possível envolvimento de outras vias nesse efeito biológico da Cur Nc.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADI. Alzheimer's disease international. (2019). World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia. Alzheimer's Disease International. <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2019.pdf>
- AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 41, n. 1, p. 40–59, jan. 2009.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, v. 15, n. 3, p. 321–387, mar. 2019.
- BARBARA, R. et al. Novel Curcumin loaded nanoparticles engineered for Blood-Brain Barrier crossing and able to disrupt Abeta aggregates. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 526, n. 1–2, p. 413–424, jun. 2017.
- CAI, Z. Monoamine oxidase inhibitors: Promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). *Molecular Medicine Reports*, v. 9, n. 5, p. 1533–1541, maio 2014.
- CHEON, S. Y. et al. Scopolamine promotes neuroinflammation and delirium-like neuropsychiatric disorder in mice. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 8376, dez. 2021.
- CORREIA, S. C.; PERRY, G.; MOREIRA, P. I. Mitochondrial traffic jams in Alzheimer's disease - pinpointing the roadblocks. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1862, n. 10, p. 1909–17, 1 out. 2016.
- HOPPE, J. B. et al. Free and nanoencapsulated curcumin suppress  $\beta$ -amyloid-induced cognitive impairments in rats: Involvement of BDNF and Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 106, p. 134–144, nov. 2013.
- LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, v. 17, 14 dez. 2020.
- MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*, v. 22, n. 22, p. 2967–2979, nov. 2001.
- RAHIMZADEGAN, M.; SOODI, M. Comparison of Memory Impairment and Oxidative Stress Following Single or Repeated Doses Administration of Scopolamine in Rat Hippocampus. *Basic and Clinical Neuroscience Journal*, v. 9, n. 1, p. 5–14, jan. 2018.
- SINGH, A. K. et al. Anti-Inflammatory Potency of Nano-Formulated Puerarin and Curcumin in Rats Subjected to the Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Journal of Medicinal Food*, v. 16, n. 10, p. 899–911, out. 2013.