

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - MG

LETÍCIA REIS

**EFEITO DA CURCUMINA SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
TERMORREGULATÓRIAS DURANTE O DESAFIO IMUNOLÓGICO COM
LIPOPOLISSACARÍDEO**

**Alfenas/MG
2019**

LETÍCIA REIS

**EFEITO DA CURCUMINA SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
TERMORREGULATÓRIAS DURANTE O DESAFIO IMUNOLÓGICO COM
LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

**Alfenas/MG
2019**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

R375e Reis, Letícia
Efeito da curcumina sobre as alterações comportamentais e
termorregulatórias durante o desafio imunológico com lipopolissacarídeo /
Letícia Reis. – Alfenas/MG, 2019.
89 f.: il. -

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2019
Bibliografia.

1. Comportamento de doença. 2. Curcumina. 3. Termorregulação.
I. Paiva Alexandre Giusti. II. Título.

CDD- 571

LETÍCIA REIS

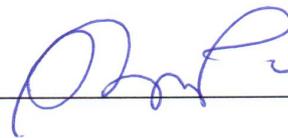
“EFEITO DA CURCUMINA SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
TERMORREGULATÓRIAS DURANTE O DESAFIO IMUNOLÓGICO COM
LIPOPOLISSACARÍDEO”.

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia Aplicada à Saúde pela
Universidade Federal de Alfenas. Área de
concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovado em: 30 / 7 / 19

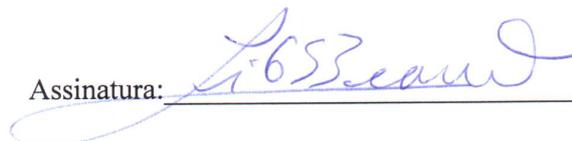
Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: _____



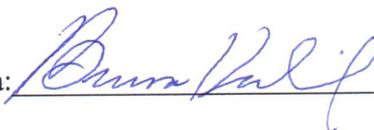
Prof. Dr. Luiz Guilherme Siqueira Branco
Instituição: Universidade de São Paulo – USP

Assinatura: _____



Profa. Dra. Bruna Kalil
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: _____



Dedico a finalização desta etapa de minha vida à Deus e à minha mãe Lêda, a quem devo tudo que sou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me guiar, iluminar, dar tranquilidade para seguir em frente com todos os meus objetivos e por não me deixar desanimar com as dificuldades.

Agradeço aos meus familiares, especialmente à minha mãe Lêda, à vovó Oralda, ao meu irmão Lucas, ao padrasto José Carlos, às tias Luísa e Ordália, aos tios Maurício e José Dias e às primas Nina e Bia, por acreditarem na minha capacidade e por não terem medido esforços para que essa etapa fosse concluída.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, pela confiança, por contribuir para a minha formação acadêmica e pela compreensão em momentos difíceis da minha vida, sobretudo nesta reta final.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Fabiana Giusti, à Prof^a. Dr^a Bruna Kalil, aos colegas de laboratório, aos estagiários Ana Laura e Medina e ao técnico José Reis pela amizade e pelo suporte oferecido ao longo dessa trajetória.

Agradeço especialmente à minha amiga Mel, pela amizade, companheirismo e por não ter medido esforços para me ensinar e ajudar. À sua família, especialmente à sua mãe Maria e ao seu filho Gu, os quais me acolheram como se eu fosse membro da família. Serei eternamente grata a vocês!

Agradeço à minha amiga Pri, a qual estive ao meu lado em momentos difíceis de minha vida.

Agradeço a Sr^a. Cida e ao seu esposo o Sr. Roberto, pela hospitalidade e por terem me acolhido com filha aqui em Alfenas.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas, por tornar-me Mestre.

E finalmente, não menos importante, agradeço aos meus “meninos” roedores, sem os quais este trabalho não seria possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Durante um processo infeccioso, além das mudanças termorregulatórias, é possível observar respostas comportamentais como: diminuição da locomoção e sociabilidade, anorexia e anedonia, que juntas são denominadas *Sickness Behavior* ou comportamento doentio. O Lipopolissacarídeo (LPS) é um componente molecular presente na parede celular de bactérias gram-negativas, que é capaz de ativar o sistema imunológico mimetizando um processo inflamatório-infeccioso, culminando no comportamento doentio. As propriedades funcionais da *Cúrcuma longa* (curcumina) têm sido amplamente investigadas, sendo estes efeitos além de sua propriedade nutricional. Dentre eles podemos citar sua ação anti-inflamatória, antidepressiva, neuroprotetora, anticancerígena e antioxidante. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar a influência da curcumina no comportamento doentio induzido pelo LPS. Inicialmente pré-tratamos ratos Wistar por 2 dias consecutivos com veículo ou curcumina nas doses de 25, 50 ou 100mg/Kg através de gavagem (p.o.). Então, 1 hora após a segunda dose de veículo ou curcumina, os animais receberam via intraperitoneal (i.p.), veículo ou LPS na dose de 500µg/Kg e as respostas comportamentais foram avaliadas após 2 horas. Nos animais do grupo da curcumina (50 e 100mg/Kg)+LPS, observamos um aumento do comportamento exploratório (no teste de campo aberto), da sociabilidade (no teste de interação social) e da ingestão alimentar, bem como a prevenção do aumento da imobilidade induzido pelo LPS (no teste de nado forçado), quando comparado ao grupo V+LPS. Entretanto, o mesmo não pode ser observado em animais que receberam curcumina na dose de 25mg/Kg, p.o., antes da administração de LPS. Curiosamente, todas as doses de curcumina testadas foram capazes de diminuir as concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL1- β induzidas pelo LPS 2 horas após a sua aplicação. No que diz respeito à termorregulação, nossos resultados mostraram que os animais receberam V+LPS e curcumina 25mg/Kg+LPS apresentaram início febril 2 horas após a administração da endotoxina e persistiu nas horas seguintes, sendo também possível observar a prevenção da febre induzida por LPS em animais que receberam o pré-tratamento com curcumina nas doses de 50 e 100mg/Kg. Frente à essas informações, sugerimos que o pré-tratamento com curcumina 50 e 100

mg/Kg em animais endotoxêmicos foi capaz de prevenir o comportamento doentio, bem como reduzir os níveis plasmáticos de TNF- α e IL1- β e prevenir a febre, possivelmente por inibir a síntese e liberação das citocinas induzidas pelo LPS.

Plavras Chave: Comportamento Doentio. Curcumina. Termorregulação.

ABSTRACT

During an infectious process, in addition to the thermoregulatory changes it's possible to observe behavioral responses such as decreased locomotion and sociability, reduced food intake, anorexia and anhedonia, which together are called Sickness Behavior. Lipopolysaccharide (LPS) is a molecular component of the cell wall of gram negative bacteria, which's able to activate the immune system mimicking an inflammatory-infectious process, culminating in the unhealthy behavior. The functional properties of *Cúrcuma longa* (curcumin) have been extensively investigated, these effects being beyond its nutritional property. Among them we can mention: its anti-inflammatory, anti-depressive, neuroprotective, anti-carcinogenic and antioxidant action. In view of the above, the objective of the present study was to investigate the influence of curcumin on the disease behavior induced by LPS. Initially, we pre-treated Wistar rats for 2 consecutive days with vehicle or curcumin at doses of 25, 50 or 100mg/Kg through gavage (p.o). Then, 1 hour after the second dose of vehicle or curcumin, the animals received either intraperitoneally (i.p), vehicle or LPS at the dose of 500µg/Kg and the behavioral responses were assessed after 2 hours. In the animals of the curcumin group (50 and 100mg/Kg)+LPS, we observed an increase in the exploratory behavior (in the open field, sociability (in the social interaction test) and food intake as well as the prevention of increased immobility time induced by LPS (in the forced swimming test) when compared to group V+LPS. However, the same could not be observed in animals receiving curcumin at a dose of 25mg/Kg, p.o, prior to LPS administration, as compared to the control. Interestingly, all doses of curcumin tested were able to decrease the plasma concentrations of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL1- β induced by LPS after 2 hours of application. Regarding thermoregulation, our results showed that the animals receiving V+LPS and curcumin 25mg/Kg+LPS presented a fever onset 2 hours after endotoxin administration and persisted at the following hours. It was also possible to note the prevention of LPS-induced fever in animals receiving pre-treatment with curcumin at doses of 50 and 100mg/Kg. In view of this information, we suggest that pre-treatment with curcumin 50 and 100mg/Kg in endotoxemic animals was able to prevent unhealthy behavior, as well as reduced

plasma levels of TNF- α and IL1- β and prevent fever, possibly by inhibiting LPS-induced cytokine synthesis and release.

Keywords: Sickness Behavior. Curcumin. Thermoregulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - LPS na parede celular da membrana de bactérias gram-negativas.....	19
Figura 2 - Resposta inata desencadeada pelo LPS	20
Figura 3 - Vias da comunicação dos Sistemas Imune-Cérebro	21
Figura 4 - Indução da Febre durante à endotoxemia	29
Figura 5 - <i>Cúrcuma longa</i>	32
Figura 6 - Estrutura química da curcumina	33
Figura 7 - Receptor de telemetria (Data Science) conectado ao computador	42
Figura 8 - Transmissor de telemetria e demonstração do programa para a coleta de dados	42
Figura 9 - Protocolo experimental do efeito do pré-tratamento com curcumina em animais submetidos à endotoxemia	43
Figura 10 - Protocolo experimental do efeito do pré-tratamento com curcumina sobre a concentração plasmática de citocinas em animais submetidos à endotoxemia	44
Figura 11 - Protocolo experimental do efeito do pré-tratamento com curcumina na febre induzida pela endotoxemia	45
Figura 12 - Protocolo experimental do efeito do pré-tratamento com curcumina em animais submetidos ao teste de Campo Aberto	47
Figura 13 - Protocolo experimental do efeito do pré-tratamento com curcumina em animais submetidos ao teste de Nado Forçado	49
Figura 14 - Protocolo experimental do efeito do pré-tratamento com curcumina em animais submetidos ao teste de Interação Social	50
Figura 15 - Protocolo experimental do efeito do pré-tratamento com curcumina em animais submetidos ao teste de Ingestão Alimentar	52
Figura 16 - Nível de concentração plasmática de TNF- α e IL1- β 2 horas após a aplicação de LPS em animais pré-tratados com curcumina	54
Figura 17 - Nível de concentração plasmática de TNF- α e IL1- β 24 horas após a aplicação de LPS em animais pré-tratados com curcumina	55
Figura 18 – Efeitos do pré-tratamento com curcumina na febre durante a endotoxemia em animais submetidos à telemetria	57
Figura 19 – Participação da curcumina nas respostas à endotoxemia	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Grupos experimentais (pré-tratamento com curcumina e desafio imunológico com LPS)	38
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Análise de variância de duas vias no teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico)47
- Tabela 2 – Análise de variância de duas vias no teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico)49
- Tabela 3 – Análise de variância de duas vias no teste de Interação Social, em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico)50
- Tabela 4 – Análise de variância de duas vias no teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico)53
- Tabela 5 – Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico), em relação à concentração plasmática de citocinas 2 horas após à endotoxemia54
- Tabela 6 – Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico), em relação à concentração plasmática de citocinas 24 horas após à endotoxemia56
- Tabela 7 – Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico), em relação as alterações termorregulatórias..59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MSH	α -melanócitos
BHE	Barreira Hematoencefálica
CLP	Ligadura e Perfuração Cecal
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
<i>Cúrcuma longa</i>	Curcumina
CVOs	Órgãos circumventriculares
cm	Centímetros
g	Gramas
HHA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	Serotonina
i.c.v.	Via intracerebroventricular
i.o.	Via oral / gavagem
i.p.	Via intraperitoneal
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10

IL-12	Interleucina 12
INF- γ	Interferon gama
IRAK	Receptor de IL-1
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
Kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
LBP	<i>S-binding protein</i>
MD2	Proteína de Diferenciação Mieloide 2
MCP-1	Proteína quimiotática de macrófago-1
MIP-24	Proteína inflamatória macrofágica-2
mg	Miligramas
mg/Kg	Miligramas por quilo
ml/Kg	Mililitro por quilo
NF-K β	Fator Nuclear kappa B
OVLTL	Órgão vascular da lâmina terminal
PGs	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2- α	Prostaglandina F2- α
PGH2	Endoperóxidos cíclicos
POA	Área pré-óptica
PVN	Núcleo paraventricular
SFO	Órgão subfornicial
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α	Fator tumoral alfa

TRAF-6

Receptor de TNF

TRL-4

Receptor toll-like 4

µg/Kg

Micrograma por quilo

LISTA DE SÍMBOLOS

Δ Delta

$^{\circ}\text{C}$ Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Endotoxemia.....	18
1.2	Comportamento Doentio.....	23
1.3	Termorregulação.....	25
1.4	Curcumina.....	31
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	OBJETIVO GERAL.....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	ANIMAIS.....	37
3.2	DROGAS.....	37
3.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	37
3.3.1	Data e hora da aplicação do LPS.....	37
3.3.2	Pré-tratamento com curcumina.....	38
3.3.3	Dosagens de citocinas.....	38
3.4	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	39
3.4.1	Campo Aberto.....	39
3.4.2	Nado Forçado.....	39
3.4.3	Interação Social.....	40
3.4.4	Ingestão Alimentar.....	40

3.5	AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA INTERNA POR TELEMETRIA...	40
3.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	42
3.6.1	Efeito do pré-tratamento com curcumina sobre o comportamento doentio.....	42
3.6.2	Efeito do pré-tratamento com curcumina sobre a concentração plasmática de citocinas durante à endotoxemia.....	43
3.6.3	Efeito do pré-tratamento com curcumina na febre induzida pela endotoxemia.....	44
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
4	RESULTADOS.....	46
4.1	INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM CURCUMINA SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA.....	46
4.1.1	Campo Aberto.....	46
4.1.2	Nado Forçado.....	48
4.1.3	Interação Social.....	50
4.1.4	Ingestão Alimentar.....	51
4.2	INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM CURCUMINA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE CITOCINAS 2 HORAS DURANTE À ENDOTOXEMIA.....	53
4.3	INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM CURCUMINA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE CITOCINAS 24 HORAS DURANTE À ENDOTOXEMIA.....	55
4.4	INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM CURCUMINA SOBRE AS ALTERAÇÕES TERMORREGULATÓRIAS DURANTE À ENDOTOXEMIA.....	57
5	DISCUSSÃO.....	60
5.1	INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM CURCUMINA SOBRE AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E TERMORREGULATÓRIAS DURANTE À ENDOTOXEMIA.....	60
6	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXO A.....	87

1 INTRODUÇÃO

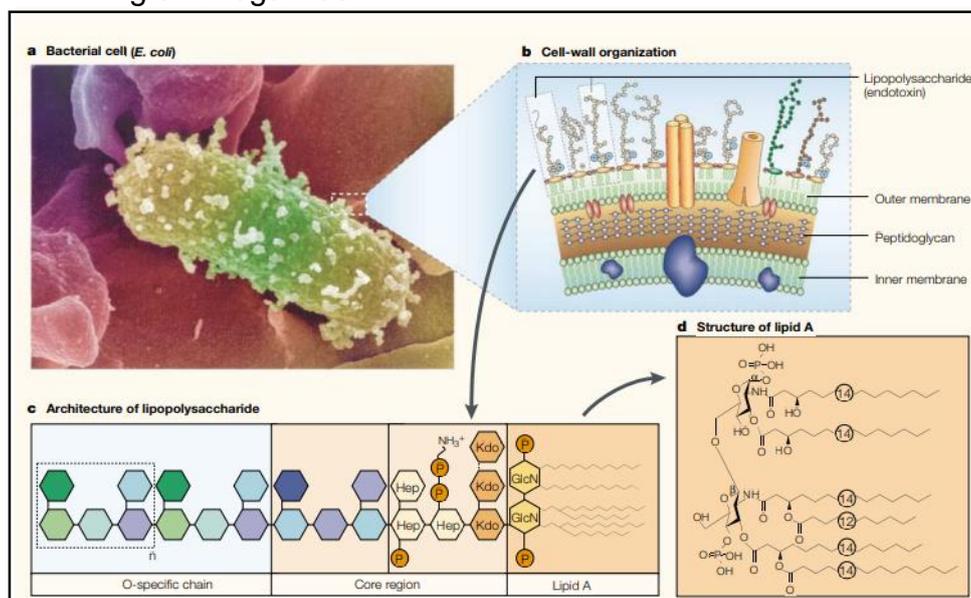
1.1 ENDOTOXEMIA

As endotoxinas são componentes externos presentes na parede celular bacteriana. Dentre elas destacam-se: o ácido teicóico e o ácido lipoteicóico provenientes de bactérias gram-positivas, e o lipopolissacarídeo (LPS), alvo de nosso estudo, procedente de bactérias gram-negativas. A presença destes elementos na corrente circulatória, é denominada endotoxemia, a qual é capaz de mimetizar uma resposta imunológica inflamatória de fase aguda no hospedeiro (GLAUSER, 2000; SILVA *et al.*, 2004; SCHEDLOWSKI; ENGLER; GRIGOLEIT, 2014).

A administração sistêmica do LPS, é comumente utilizada em modelos animais experimentais para simular a ativação do sistema imune. Além de ser prático e reproduzível, em muitas espécies animais, este modelo permite-nos padronizar doses e mimetizar muitos efeitos observados em pacientes com processos inflamatórios-infecciosos como: alterações hemodinâmicas, redução da perfusão tissular, hiporresponsividade a agentes vasoconstritores, diminuição do débito urinário, coagulação intravascular disseminada, produção de citocinas na circulação sanguínea, bem como alterações termorregulatórias e comportamentais (BEM-SAHAUL *et al.*, 1999; MACARTHUR *et al.*, 2000; SCHEDLOWSKI; ENGLER; GRIGOLEIT, 2014).

O LPS é o principal componente molecular da membrana externa de bactérias gram negativas, tais como a *Escherichia coli*, o qual pode ser reconhecido pelas células do sistema imune do hospedeiro. Estruturalmente, esta endotoxina é constituída por antígeno-O (polissacarídeos O específicos), oligossacarídeos e componentes do lipídio A. O antígeno O, responsável por conferir a especificidade sorológica das bactérias, está localizado na parte mais externa e hidrofílica da membrana bacteriana. Este, é composto de 1 a 40 unidades repetitivas de fosfolipídeos, as quais são únicas entre as espécies. Os oligossacarídeos (ou core), estão localizados no centro da molécula, o qual é dividido em duas partes: externa (que se liga ao antígeno O), e interna (que se liga ao lipídio A) (Figura 01) (MANSOUR; HASSAN; GEORGY, 2017; WANG; QUINN, 2010).

Figura 1 - LPS da parede celular da membrana externa de bactérias gram-negativas



Fonte: Adaptado de BEUTLER; RIETSCHER, 2003.

Nota: A) Micrografia eletrônica de *Escherichia coli*. B) Representação esquemática da localização do lipopolissacarídeo (LPS, endotoxina) na parede celular bacteriana. C) Arquitetura do LPS. D) Estrutura primária do centro tóxico do LPS, o componente lipídico A.

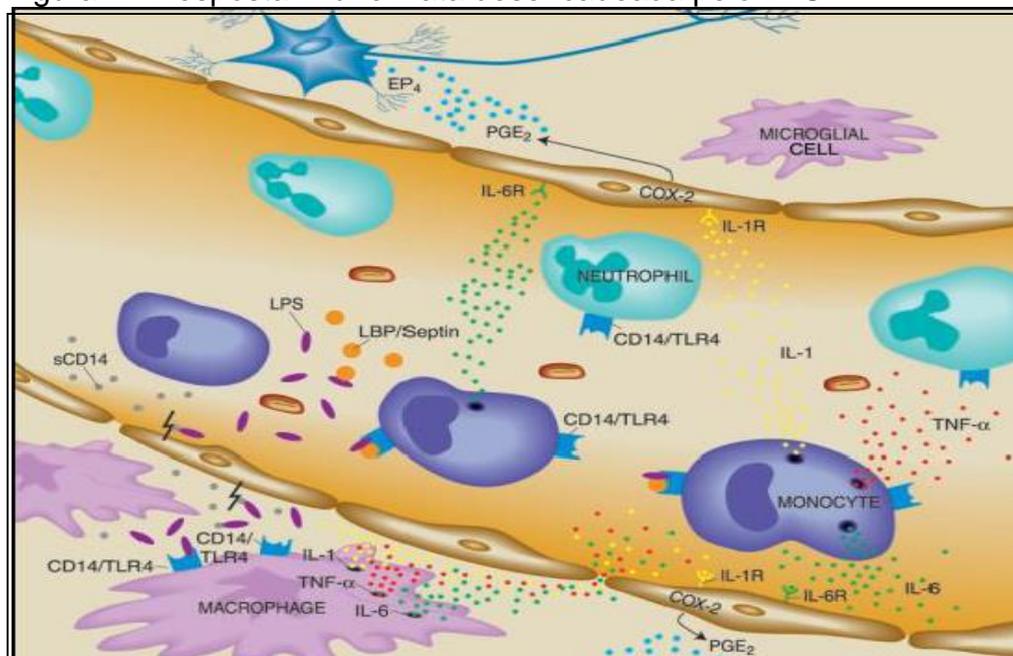
O lipídio A, é uma porção glicofosfolipídica que ancora o LPS na membrana externa das células do sistema imune, desencadeando a resposta inflamatória no hospedeiro (KOCH *et al.*, 2012; RAETZ; WHITFIELD, 2002; SU, DING, 2015).

O LPS é uma toxina apolar, portanto, necessita de lipoproteínas de alta densidade para ser transportado na corrente circulatória, como a *S-binding protein* (LBP). Deste modo, o LPS liga-se ao LBP formando um complexo (LBP:LPS), que por sua vez, é reconhecido pelos receptores CD14–MD2 presentes nas membranas dos macrófagos. Conseqüentemente, estes receptores enviam sinais para o interior da célula, por meio do *toll-like receptor* (TLR-4), também presentes na membrana das células imunes, desencadeando uma série de eventos intracelulares resultando na ativação do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) (FLORES-MARTINEZ *et al.*, 2018; GALIC; RIAZI; PITTIMAN, 2012; KELMER, 2009).

Por ordem, o NF- κ B ativa os genes que codificam mediadores pró-inflamatórios como: prostaglandinas (PGs), histamina, serotonina, óxido nítrico sintetase (INOS), cicloxigenase (COX) e citocinas. Dentre as citocinas pró-

inflamatórias, destacam-se: interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e o fator tumoral alfa (TNF α) (HAVA *et al*, 2006; NISHIO *et al.*, 2013).

Figura 2 - Resposta imune inata desencadeada pelo LPS



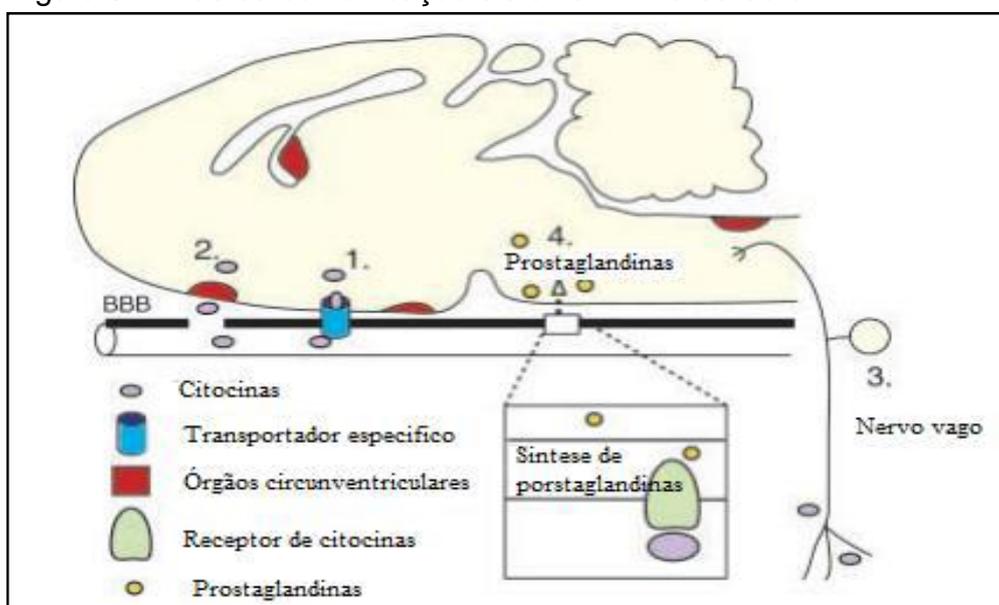
Fonte: HANG; RIVEST, 2003.

Nota: Secreção de citocinas por monócito/neutrófilos e macrófagos teciduais circulantes pela exposição ao LPS. Ligação do LPS com a LBP. O complexo recém-formado ativa diferentes células por ligação aos seus receptores CD14 e TLR4. O complexo LPS/LBP é eficaz em ativar células de origem mielóide (neutrófilos, monócitos, macrófagos e microglia), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-1, TNF e IL-6. Estas citocinas podem se ligar aos seus receptores cognatos expressos na superfície de células que formam a BHE, mas não são essenciais para a mediação dos efeitos de LPS no SNC.

A resposta as alterações imunológicas, fisiológicas e comportamentais induzidas pelo sistema imunológico, é necessária para que haja a comunicação entre o Sistema Imune e o Sistema Nervoso Central (SNC). Como mencionado, a ativação periférica do sistema imune inato, estimula a secreção de citocinas no SNC, as quais fazem o uso de diferentes vias para alcançar o cérebro. São elas: através de transportadores específicos localizados na barreira hematoencefálica (BHE), (porém essa via não desempenha papel importante durante a fase aguda da inflamação); pelos órgãos circunventriculares, que são regiões cerebrais especializadas desprovidas de BHE, (as quais desencadeiam resposta adaptativa);

pela ativação dos nervos sensoriais periféricos (geralmente pelo nervo vago aferente), onde as citocinas chegam até as terminações nervosas periféricas vagais, e ativam os receptores presentes nessas regiões, iniciando então a transmissão de impulsos nervosos; e pelas citocinas, que também podem entrar em contato com os receptores endoteliais das células cerebrais (DANTZER *et al.*, 1998; ENGBLOM *et al.*, 2002; HUA-YEH *et al.*, 2018 SCHEDLOWSKI; ENGLER; GRIGOLEIT, 2014).

Figura 3 - Vias da comunicação sistema imune-cérebro.



Fonte: Adaptado de ENGBLOM *et al.*, 2002.

Nota: Vias da sinalização através da barreira hematoencefálica. 1) Transporte mediado por carreador. 2) Ligação de citocinas nos órgãos circunventriculares. 3) Ligação de citocinas no nervo vago. 4) Citocinas mediando a produção de prostaglandinas em células associadas com a barreira hematoencefálica.

Estudos recentes indicam que além das células do sistema imunológico, o órgão subfornicial (SFO), que corresponde à uma área do cérebro que detecta diretamente o LPS circulante, também é capaz de produzir citocinas pró-inflamatórias. Acredita-se que as moléculas circulantes (incluindo o LPS), difundam-se livremente no SFO, uma vez que esta região cerebral, assim como os órgãos circunventriculares, também é livre de BHE. Outro dado encontrado na literatura, é que as membranas perivasculares do SFO, são separadas da membrana basal externa, as quais são derivadas de células parenquimatosas,

enquanto a membrana basal interna, é derivada de células endoteliais, as quais, em conjunto, formam um grande espaço perivascular fora do parênquima cerebral (TAKEMURA *et al.*, 2019).

Como o LPS tende a formar micelas com polissacarídeos hidrofílicos, voltados para a parte externa, é improvável que o LPS circulante simplesmente se difunda no SFO. Além disso, os macrófagos em torno da vasculatura do SFO, foram propostos como células de origem de IL-1 β . Estes dados, levantam a possibilidade de que os macrófagos no espaço perivascular do SFO, são responsáveis pela produção de IL-1 β em resposta ao LPS circulante (MORITA *et al.*, 2012; MORITA *et al.*, 2016; TAKEMURA *et al.*, 2019).

No tocante as citocinas entram em contato com os receptores endoteliais, presentes nas células cerebrais, culminando na síntese de PGs via ativação da enzima cicloxigenase (COX-2), a qual é a principal responsável pela síntese de PGs durante o processo inflamatório. As PGs são moléculas de origem lipídica procedentes do metabolismo do ácido araquidônico, formadas à partir da clivagem de fosfolípidios de membrana pela ação da fosfolipase A2. A conversão do ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos (PGH2) ocorre pela ação das ciclooxigenases (COX), as quais possuem duas isoformas, referidas como: COX-1 e COX-2 (KAWAHARA *et al.*, 2015; 1998; KHAN *et al.*, 2002).

As COX 1 e 2 possuem algumas diferenças, o que lhes confere funções distintas. A COX-1 é classificada como uma enzima constitutiva, e é expressa em vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino e rins. Já a COX2, está presente nos locais de inflamação, sendo, por isso, classificada como uma enzima indutiva. Esta enzima é expressa por células envolvidas no processo inflamatório como macrófagos, monócitos e linfócitos. Todavia, também pode ser encontrada em outros tecidos e órgãos como: rins, cérebro, útero, ovário, cartilagem, ossos e endotélio vascular (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

Em resposta aos estímulos inflamatórios-infecciosos, foi demonstrado que a prostaglandina E2 (PGE2) difunde-se na microvasculatura cerebral e atua posteriormente em receptores neurais denominados EP3 e EP4. Estes receptores, estão presentes no tronco encefálico e nas áreas hipotalâmicas, tal como o núcleo paraventricular (PVN), o qual está envolvido no controle da atividade do eixo

Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e na regulação da temperatura corporal (EK *et al.*, 2000; KAWAHARA *et al.*, 2015; RIVEST, 2001).

1.2 COMPORTAMENTO DOENTIO

Ao longo de uma infecção aguda ou frente à um desafio imunológico, o organismo hospedeiro desenvolve uma resposta de defesa generalizada, denominada reação de fase aguda. No intuito de poupar energia para combater o agente infeccioso, é possível observar alterações comportamentais como: diminuição do comportamento reprodutivo, menor atividade motora, ocorrência de alterações no padrão do sono, anorexia, perda de peso e redução do contato social. É possível observar também, efeitos semelhantes a depressão (*depressive-like*), particularmente a anedonia, caracterizada pela perda aparente do interesse por atividades cotidianas e positivas. Esta resposta pode ser evidenciada no animal, por meio da redução do consumo de alimentos palatáveis e preferenciais. Coletivamente, estas respostas comportamentais são denominadas *Sickness Behavior* ou comportamento doentio (DE PAIVA *et al.*, 2010; NILSSON *et al.*, 2017).

No intuito de caracterizar o comportamento doentio, Hart (1988), atestou que o comportamento doentio de um animal, acometido por uma doença, não é especialmente adaptativo. Trata-se, na realidade, do resultado de processos de debilitação associado a outros efeitos secundários, como a incapacidade de obtenção de água e alimentos. Hart ainda afirma, que os comportamentos característicos de animais doentes, não são específicos a nenhuma espécie animal em particular, ou seja, podem ser encontrados em diferentes animais incluindo o homem.

Desta forma, o comportamento doentio não seria um mal-adaptativo ou mesmo um efeito indesejável da doença, mas sim, uma estratégia comportamental visando a sobrevivência durante momentos críticos da vida do animal. Isto é, os animais doentes não se encontram incapazes de realizar tarefas ou de responder à estímulos ambientais, apenas não o fazem, devido à baixa prioridade que as mesmas têm no determinado contexto (DANTZER, 2001; KINOSHITA, 2007; OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2019).

A redução da atividade exploratória-locomotora e o aumento do comportamento tipo-ansioso, são respostas comumente encontradas no comportamento doentio. A diminuição do comportamento social, observadas em animais jovens pertencentes à mesma espécie, tem sido utilizada como uma forma eficiente para avaliar o comportamento doentio em modelos experimentais. A utilização de animais juvenis, permite-nos estudar mais profundamente a interação social, isolando outros comportamentos que ocorrem com animais adultos como: o comportamento de agressão e o comportamento sexual (DANTZER, 2001; OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2019).

Alguns estudos demonstram que a administração de LPS (50-500 μ g/Kg), IL-1 β e TNF- α em ratos e camundongos adultos, diminui o tempo gasto na exploração de animais juvenis destas mesmas espécies. Essa resposta pode ser avaliada pelo parâmetro de locomoção-exploração, nos testes de claro escuro, campo aberto e interação social (BANASIKOWSKI *et al.*, 2015; BLUTHE; BLUTHE, 1994; DELLAGIOIA; HANNESTAD, 2010).

A ativação do sistema imune pela administração de LPS e IL-1 β , é capaz de promover a diminuição da exploração de ambientes novos e da sociabilidade, bem como a redução da ingestão alimentar. Demonstrando, dessa forma, que os estímulos citados são capazes de promover a anedonia em animais desafiados imunologicamente (DELLAGIOIA; HANNESTAD, 2010; LARSON *et al.*, 2001; STONE *et al.*, 2006).

Segundo Lindthorst e estudiosos (1995), a diminuição das atividades gerais dos animais durante o comportamento doentio, evidenciado pelos escores de locomoção, ingestão de alimento e água e auto-limpeza, está correlacionado com a redução da concentração extracelular de serotonina (5-HT), e do seu metabólito ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) no hipocampo.

A modificação dos parâmetros comportamentais considerados normais para os comportamentos característicos do estado doentio, é imprescindível para que o organismo se debele contra o agente infeccioso, no intuito de combatê-lo. Como mencionado, o comportamento doentio, está relacionado com uma estratégia motivacional para que o organismo enfrente a doença. A motivação é um estado central que reorganiza a percepção e ação, permitindo, desta forma, que o indivíduo

seleccione a melhor estratégia visando a sobrevivência. Sendo esta, passível de mudanças conforme a situação enfrentada pelo organismo (LASSELIN et al., 2017).

A questão motivacional, tem sido demonstrada por experimentos que promovem o comportamento doentio. Dantzer (2009) e Li e estudiosos (2015), observaram que após a administração de LPS, os animais apresentaram comportamento tipo-depressivo. Esta resposta é avaliada pelos parâmetros: de perda de prazer (anedonia) no teste de preferência à sacarose, e pelo aumento do tempo de imobilidade, nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda.

O contexto ambiental que o animal endotoximizado encontra-se, é de fundamental importância, no que diz respeito à estratégia adotada. Miller (1964), observou que após aplicar endotoxina bacteriana em animais treinados a pressionarem uma barra (com finalidade de receber água), desempenhavam tal tarefa com uma significativa redução, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, quando estes animais eram colocados em uma plataforma giratória (que parava por alguns instantes quando o animal apertava uma barra), os mesmos apresentaram menor latência para executar tal tarefa. A interpretação para estes achados, demonstram que o tratamento com endotoxina não provoca necessariamente a diminuição global dos comportamentos, mas sim, a influência na tomada de decisões sobre a prioridade dos comportamentos a serem executados, tratando-se, portanto, de uma questão motivacional.

1.3 TERMORREGULAÇÃO

As alterações termorregulatórias, como a febre, também estão envolvidas na defesa à entrada de patógenos no organismo. A febre é uma resposta complexa, a qual envolve diversos componentes como os sistemas endócrino e autonômico, metabólico e comportamental. A elevação da temperatura em animais endotérmicos (de sangue quente), demanda um alto custo metabólico, de tal forma, que o aumento de 1°C na temperatura interna, requer o aumento de cerca de 10 a 12,5% da taxa metabólica. Na literatura, há evidências crescentes de que o aumento de 1 a 4°C na temperatura corporal central, (o que ocorre na febre), está associado a defesa à entrada de patógenos no hospedeiro. Indicando desta forma, que a febre possui um componente filogenético, relacionado ao aumento da

resposta de defesa do organismo frente à uma infecção, bem como o aumento da sobrevivência do hospedeiro (BICEGO; BARROS; BRANCO, 2007; EVANS *et al.*, 2015).

A temperatura interna, varia em relação a fatores ambientais e biológicos como: hora do dia, local da medição da temperatura, nível de atividade física, idade, sexo, processos inflamatórios-infecciosos, entre outros. Apesar dessa variabilidade, a temperatura interna é rigidamente regulada dentro de um intervalo razoavelmente constante, denominado *set point* de regulação térmica. O *set point* de regulação térmica, é estabelecido como “o valor de uma variável que um organismo saudável busca para estabelecer pelo processo de regulação”. Este valor é encontrado por meio da integração de informações térmicas, centrais e aferentes, pelos neurônios hipotalâmicos (NAKAMURA, 2011; THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, 2001).

A regulação da temperatura interna está sob controle de algumas estruturas neurais como: o hipotálamo, sistema límbico, tronco cerebral, formação reticular, medula espinhal e gânglios simpáticos, os quais são responsáveis por integrar as informações térmicas aferentes e centrais, antes de estimular a ativação das respostas fisiológicas e comportamentais. Embora a estimulação das áreas do tronco cerebral e da medula espinhal possam evocar mecanismos termorregulatórios específicos, estudos feitos *in vivo* demonstram que a área pré-óptica do hipotálamo anterior (POA), é o principal centro de regulação da temperatura interna (BOULANT, 2000; BLOMGVIST; ENGBLOM, 2018; NAKAMURA, 2011).

Na região da POA, podem ser encontrados dois tipos de neurônios: os termossensíveis (sensíveis ao calor e ao frio) e os insensíveis, cuja frequência de disparo é afetada tanto por variações da temperatura interna, como pela influência de conexões diretas com os termorreceptores distribuídos na pele e nos músculos (OGOINA, 2011).

Na hipotermia, ocorre a diminuição do disparo de neurônios sensíveis ao calor, e aumento do disparo de neurônios sensíveis ao frio, culminando na ativação dos mecanismos de ganho de calor, bem como na prevenção da sua perda. Enquanto na hipertermia, acontece o contrário, há um aumento do disparo dos neurônios

sensíveis ao calor, e diminuição dos disparos dos neurônios sensíveis ao frio, levando à ativação dos mecanismos de perda de calor e inibição de ganho do mesmo. Desta forma, em respostas as variações de temperatura, os neurônios hipotalâmicos iniciam respostas termorregulatórias apropriadas para a retenção, produção ou perda de calor, no intuito de manter constante a temperatura interna (EVANS *et al.*, 2015; LIM; BYRNE; LEE, 2008; MACKOWIAK, 2005).

A febre, portanto, é definida como uma elevação controlada da temperatura interna, acima dos níveis normais, (36,5°C), resultante da alteração do *set point* termorregulatório hipotalâmico. Os mecanismos envolvidos no aumento do *set point*, consistem nas alterações da frequência de disparos dos neurônios termorregulatórios, (como mencionado), os quais, nos processos inflamatórios-infecciosos, são promovidos por substâncias mediadoras da resposta febril – os pirógenos (DINARELLO; CANNON; WOLFF, 1988).

Os pirógenos, são classificados com base no seu local de produção, podendo ser exógenos, (produzidos fora do hospedeiro), ou endógenos, (produzidos dentro do organismo do hospedeiro). Os pirógenos exógenos, são essencialmente microrganismos inteiros ou parte deles, como o LPS ou produtos de microrganismos, como por exemplo, as toxinas. No que diz respeito aos pirógenos endógenos, estes, são produzidos por células do sistema imune como: neutrófilos, macrófagos e linfócitos, bem como por células do SNC, (astrócitos e micróglia), em resposta aos pirógenos exógenos. Os principais agentes pirogênicos endógenos são as citocinas, (IL-6, IL1- β , TNF- α e o interferon gama (INF- γ)) (LEON, 2005; MACKOWIAK, 2005; OGOIA, 2011).

A administração de pirógenos, culmina na produção de PGs, as quais têm papel crucial na produção da febre. A PGE2 é considerada o principal eicosanoide envolvido na resposta febril. Embora outros derivados do ácido araquidônico, particularmente a prostaglandina F2 α (PGF2 α), também possam induzir febre em animais experimentais. O estado febril potencializa a imunidade inata e adaptativa, induzindo linfocitose, aumento da produção de anticorpos e da capacidade fagocítica dos neutrófilos, limitando a proliferação microbiana (BLOMGVIST; ENGBLOM, 2018; ENGBLOM *et al.*, 2002).

Existem ainda, substâncias denominadas criógenos, os quais, ao contrário dos pirógenos, limitam as elevações do *set point* termorregulatório. Desta forma,

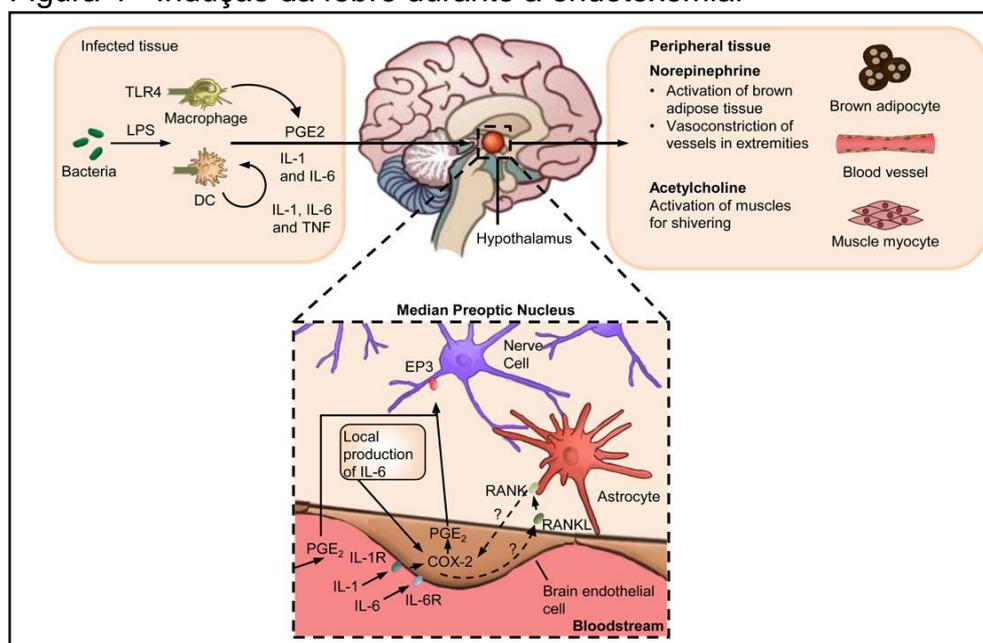
impedem que sejam atingidos valores de temperatura capazes de comprometer as funções vitais do organismo. Entre eles, podemos citar: hormônio estimulante de α -melanócitos (α -MSH), glicocorticoides e a interleucina 10 (IL-10) (ALEXANDER; FEWELL, 2011; LEDEBOER *et al.*, 2002).

A endotoxemia é acompanhada pela alteração da temperatura corporal, sendo a febre, o sinal termorregulatório mais frequente no processo inflamatório-infeccioso. Entretanto, a hipotermia também pode ocorrer agravando significativamente o prognóstico do paciente. Esta, quando associada ao choque, pode ser resultado da redução da produção de calor, em conjunto com o comportamento de busca do frio, sugerindo desta forma, que a hipotermia na inflamação sistêmica grave pode constituir uma resposta adaptativa (HARRIS *et al.*, 1987; ROMANOSVSKY, *et al.*, 1997; ROMANOSVSKY, *et al.*, 1998).

A indução e a manutenção da febre durante um processo infeccioso, envolvem uma interação coordenada entre o sistema imune inato, e os circuitos neuronais dos sistemas nervoso central e periférico. Como descrito anteriormente, a detecção dos padrões moleculares associados a patógenos, como o LPS, pelos receptores TLR4 e CD14, leva à ativação do fator de transcrição NF κ B, e conseqüentemente, à síntese de citocinas pró-inflamatórias, e prostaglandinas (pela ação da COX-2). Muito do entendimento atual dos mecanismos moleculares subjacentes à febre, decorre de vestígios, onde roedores foram injetados com LPS. Neste modelo, as PGs, particularmente a PGE₂, é considerada um importante mediador pirogênico da febre (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; HASDAY; THOMPSON; SINGH, 2014; ROTH; BLATTEIS, 2014; SAPER; ROMANOSVSKY; SCAMMELL, 2012).

A PGE₂ integra os sinais de entrada de citocinas pirogênicas, (produzidas em resposta a estímulos patogênicos), alterando a frequência de disparo dos neurônios da POA e a efetuação das respostas fisiológicas e comportamentais do organismo, culminando na elevação do *set point* termorregulatório, gerando o estado febril. No início desta resposta, a PGE₂ também é sintetizada por células hematopoiéticas na periferia, (após a ativação do TLR4, mediado pelo LPS), isto é, antes da detecção de citocinas circulantes, e viaja através da barreira hematoencefálica para iniciar a febre (Figura 4) (ARONOFF; NEILSON, 2003; EVANS; REPASKY; FISHER, 2015).

Figura 4 - Indução da febre durante a endotoxemia.



Fonte: EVANS; REPASKY; FISHER, 2015 (Adaptado pela autora).

Nota: O reconhecimento do LPS, por receptores TLR4 e CD14, impulsionam a ativação das células dendríticas e macrófagos. Estas células da imunidade inata, liberam PGE2, bem como citocinas pirogênicas (IL1, IL-6 e TNF- α), as quais atuam sistemicamente para induzir a febre. A IL-6, atua a jusante da IL-1, na região pré-óptica do hipotálamo, induzindo a COX-2 a produzir PGE2 adicional. A PGE2 induz a expressão de receptores EP3, fazendo com que o sistema nervoso simpático ative a liberação de norepinefrina, elevando o *set point* termorregulatório, aumentando a termogênese do tecido adiposo marrom, bem como induzindo vasoconstricção a fim de evitar a perda de calor passivo. Ademais, a acetilcolina contribui para a febre, estimulando os miócitos musculares para induzir tremores.

Podemos observar na figura 4, que a febre mediada pelo LPS, ocorre por meio de mecanismos autonômicos, impulsionados pela ligação de PGE2 aos receptores EP3, os quais estão expressos por neurônios termorreguladores na POA. Os endotérmicos, elevam a temperatura corporal através da síntese e liberação de norepinefrina, o que aumenta a termogênese no tecido adiposo marrom, culminando na vasoconstricção das extremidades, no intuito de reduzir a perda de calor passivo (BLOMGVIST; ENGBLOM, 2018; NAKAMURA; MORRISON, 2008).

Além disso, a sinalização através do neurotransmissor acetilcolina, estimula a musculatura a converter a energia química armazenada em energia térmica,

aumentando as taxas metabólicas gerais. Adicionalmente, assim como os endotermos, os ectotérmicos, também envolvem a termorregulação comportamental em busca de calor, a qual não requer neurônios medianos pré-ópticos, embora as vias envolvidas ainda sejam em grande parte desconhecidas (ALMEIDA et al., 2006; EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; MORRISON; MADDEN; TUPONE, 2012; ROMANOVSKY, 2007).

Respostas como pilo ereção, vasoconstricção cutânea e alterações comportamentais de retenção de calor, ocorrem devido ao resfriamento da POA, o que leva ao aumento da temperatura corporal. Posteriormente a este evento, ocorre as respostas de produção de calor, tais como: termogênese (provocada por tremores e pelo aumento da atividade metabólica do tecido adiposo marrom), e pela termogênese química, (decorrente da elevação dos níveis de hormônios metabólicos: tiroxina, glicocorticoides e catecolaminas). Contudo, o aquecimento da POA promove sudorese, vasodilatação cutânea, e respostas comportamentais favorecendo a perda de calor (BOULANT, 1998).

Adicionalmente, Bluthé e colaboradores (1996), evidenciaram a importância das aferências vagais no processo de resposta inflamatória-infecciosa. Neste estudo, ratos foram submetidos à retirada das terminações das aferências vagais e posteriormente à uma injeção i.p. e i.c.v de IL1- β . Os autores demonstraram que a vagotomia atenuou a hiperalgesia e os efeitos comportamentais (semelhantes à ansiedade e depressão), em resposta à administração i.p. de IL1- β , mas não intracerebroventricularmente.

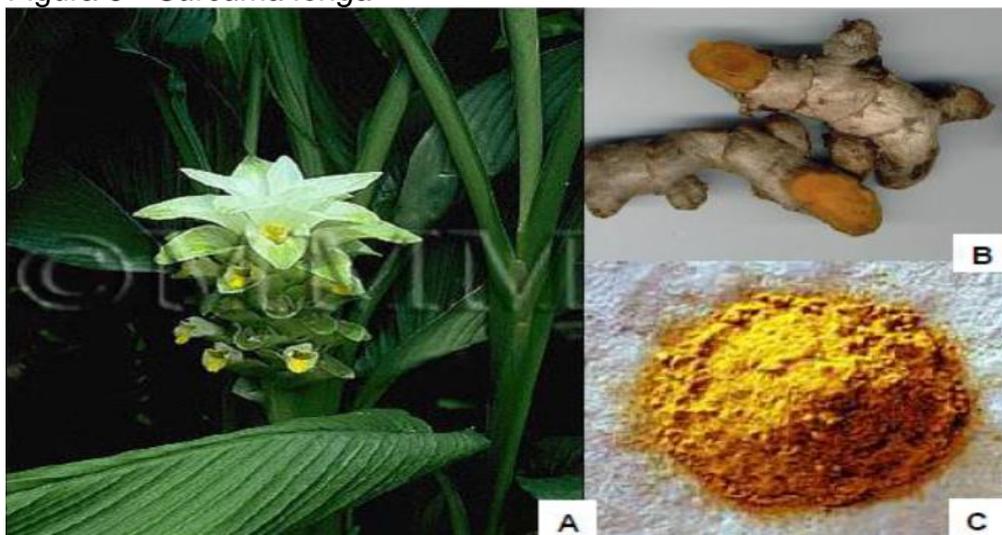
Recentemente, surgiu uma nova hipótese sobre como os sinais imunes periféricos poderiam atravessar ou contornar a BHE, para influenciar o cérebro no desenvolvimento da febre. Essa suposição, inclui a ação pirogênica direta no Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVLT), o qual pertence aos órgãos circumventriculares (CVOs), e localiza-se ao lado dos neurônios termorregulatórios no hipotálamo pré-óptico. Os capilares dos CVOs são fenestrados, o que permite que macromoléculas presentes na corrente circulatória alcancem as células dentro dessas estruturas, as quais têm a capacidade de monitorar informações importantes para manter a homeostase (ENGBLOM, 2018; FERGUNSON, 2014; SISO et al., 2010;).

No início, foram sugeridos que os CVOs transmitiam sinais inflamatórios aos neurônios, por meio de estruturas cerebrais profundas. Em apoio a esta ideia, foi demonstrado, que além dos CVOS, o OVLT também expressa receptores TRL para os padrões moleculares associados a patógenos, como o LPS e citocinas (BLOMGVIST; TSAI *et al.*, 2014; BORNER *et al.*, 2017; ENGBLOM, 2018).

1.4 CURCUMINA

A utilização de alimentos na prevenção e no tratamento de doenças é comumente utilizado a milhares de anos. Considerado um alimento funcional, ou seja, com propriedades que vão além do seu valor nutritivo básico, os potenciais terapêuticos da *Cúrcuma longa* têm sido amplamente investigados nos últimos anos (BARANKEVIEZ; SALGADO, 2015; SEEHOFER *et al.*, 2010; SIRÓ *et al.*, 2008; SOMAPAMIT *et al.*, 2009; XIAO *et al.*, 2012).

Esta planta é definida como rizomatosa, e pertence à família *Zingiberaceae*, a qual cresce em regiões quentes e chuvosas de países como: China, Índia, Indonésia, Jamaica e Peru. No Brasil, a *Cúrcuma longa* (curcumina) foi introduzida no início da colonização dos portugueses, contudo, foram os bandeirantes que disseminaram o seu uso pelo interior do país, onde recebe o nome de Curcumina ou Açafrão da Terra (AGGARWAL *et al.*, 2013; GOEL *et al.*, 2008; JAYAPRAKASHA *et al.*, 2012; TEIXEIRA, 2009;).

Figura 5 - *Cúrcuma longa*

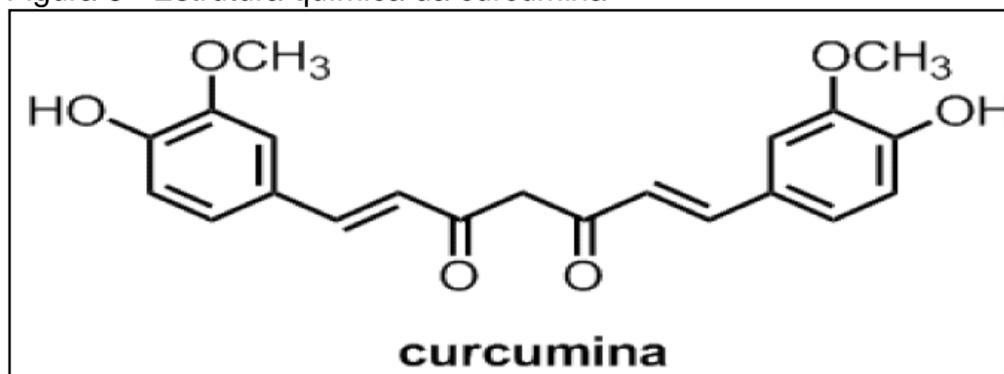
Fonte: BASNET; SKALKO-BASNET, 2011.

Nota: A) *Cúrcuma longa*, planta com flor. B) Raiz cortada recentemente. C) Pó da raiz. A figura A foi obtida com permissão do museu de matéria médica do Japão.

A parte mais utilizada da curcumina é o rizoma, o qual fica localizado na parte mais longa de sua raiz, uma vez que detém a maior concentração de substâncias responsáveis pelo seu valor mercadológico e sua ação terapêutica. Os principais componentes químicos dos rizomas da *cúrcuma* são: os curcuminóides ou polifenóis naturais (curcumina 60%, desmetoxicurcumina 22% e bisdesmeoxicurcumina 18%) e em menores proporções (2-5%), os óleos essenciais, compostos principalmente por turmerona dehidroturmerona e cetonas aromáticas, as quais são responsáveis pelas propriedades organolépticas desta planta (BIANCHI; ANTUNES, 1999; COSTA, 2015).

Os curcuminóides possuem propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antidepressiva, anticancerígena, neuroprotetora, hepatoprotetora e cardioprotetora, os quais são provenientes do seu principal princípio ativo, a curcumina. A curcumina foi isolada pela primeira vez por Voguel, em 1842, e caracterizada como uma molécula lipofílica (de fácil passagem na membrana celular), e insolúvel (na água e no éter). Sua estrutura química foi descrita por Lampe e Milodebeska em 1910, cuja fórmula é $C_{21}H_{20}O_6$ (diferuloilmetano) e peso molecular 368,37 (ARAUJO; LEON, 2001).

Figura 6 - Estrutura química da curcumina



Fonte: ARAUJO; LEON, 2001.

Em um modelo de sepse, Seehofer et al (2010), evidenciaram que o pré-tratamento intraperitoneal (i.p.) com curcumina (100mg/Kg), apresentou efeito hepatoprotetor em animais com sepse, induzidos por ligadura e perfuração cecal (CLP), hepatectomia parcial ou ambos os procedimentos. Este composto foi capaz de reduzir a liberação de enzimas hepáticas, bem como atenuar a expressão das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , através da redução do RNAm no tecido hepático. Adicionalmente, foi demonstrado por Wu e colaboradores (2006), que o tratamento oral com curcumina (3 dias), antes do estímulo séptico induzido por CLP, reduziu a liberação de enzimas hepáticas, bem como atenuou a expressão do RNAm das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , no tecido hepático.

Xiao e colaboradores (2012), evidenciaram em fluidos broncoalveolares de animais septicêmicos, que o tratamento com curcumina, 50 ou 200mg/Kg, i.p., duas horas após a indução da septicemia por CLP, apresentaram redução da lesão pulmonar e atenuação do processo inflamatório. Uma vez que houve uma significativa redução da atividade da mieloperoxidase (MPO) e do malondialdeído (MDA), (que são marcadores de peroxidação lipídica), bem como a diminuição das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-8, e do fator inibidor de ativação dos macrófagos, 6, 12 e 24 horas após o CLP.

Outro fato interessante, apontado por Somapamit e estudiosos (2009), é que em camundongos endotoxêmicos, que receberam o tratamento ou pré-tratamento com curcumina, nas doses de 50 e 100mg/Kg, apresentaram significativa modulação da frequência cardíaca e restauração da pressão arterial, de maneira dose-dependente. Além disso, a responsividade vascular dos animais submetidos

ao desafio imunológico com LPS 10mg/Kg, foi melhorada após o tratamento com curcumina, em ambas as doses. A melhora hemodinâmica e da resposta vascular durante a endotoxemia, foram relacionadas pelos autores ao alívio do estresse oxidativo. Isto deve-se à redução da síntese de superóxido derivado da aorta, supressão da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, bem como a diminuição do óxido nítrico urinário, os quais apresentam-se em altas quantidades durante à endotoxemia.

Quanto aos aspectos comportamentais, a pesquisa de Kulkarni e colaboradores (2008), demonstraram em um modelo de depressão, que camundongos tratados intraperitonealmente com 20mg/Kg de curcumina, 30 minutos antes de receberem Reserpina (1ml/100g, i.p.), apresentaram redução do tempo de imobilidade no teste de nado forçado, quando comparados ao grupo controle. Evidenciaram ainda, que as concentrações cerebrais de serotonina estavam significativamente superiores em animais pré-tratados com curcumina, quando comparado aos animais que não receberam o pré-tratamento com este composto. Segundo os pesquisadores, a curcumina possui capacidade de segmentar várias cascatas simultaneamente, desempenhando uma atividade neuroprotetora.

Xu Ying e colaboradores (2005 b), demonstraram em camundongos pré-tratados com curcumina 5 e 10mg/Kg, i.p., e posteriormente desafiados com LPS, na dose de 0,83mg/Kg, i.p., apresentaram aumento da atividade exploratória, no teste de campo aberto, e redução do tempo de imobilidade, no teste de nado forçado, quando comparado ao grupo controle.

Corroborando com este estudo, Wang et al (2014), demonstraram um resultado semelhante em animais que receberam o tratamento com curcumina, na dose de 50mg/Kg, i.p., antes de serem submetidos ao desafio imunológico com LPS 0,83µg/Kg, i.p., onde observou-se uma prevenção da redução do consumo à sacarose, no teste de preferência à sacarose e diminuição do tempo de imobilidade, nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda, quando comparados aos animais que não receberam o pré-tratamento com este composto.

Como exposto, são diversos os estudos que evidenciam o potencial anti-inflamatório da curcumina, através de seu tratamento ou pré-tratamento em diferentes modelos experimentais. Contudo, apesar do amplo conhecimento, ainda

são escassos na literatura, dados consistentes a respeito do pré-tratamento agudo com curcumina sobre o comportamento doentio e a febre, induzidos pelo lipopolissacarídeo. Frente à isso e tomado em conjunto todos os modelos de estudo que evidenciam os benefícios da curcumina, hipotetizamos que o pré-tratamento com curcumina previne o comportamento doentio e a febre.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da curcumina sobre o comportamento doentio induzido pelo LPS em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar o efeito da administração intraperitoneal de LPS na dose de 500µg/Kg sobre as alterações comportamentais 2 horas após sua aplicação;
- b) Avaliar as alterações comportamentais durante o *Sickness Behavior* em animais que receberam pré-tratamento com curcumina 25, 50 ou 100mg/Kg por gavagem;
- c) Avaliar a ação do pré-tratamento com curcumina 25, 50 ou 100mg/Kg p.o sobre as alterações termorregulatórias durante a endotoxemia;
- d) Avaliar a ação do pré-tratamento com curcumina 25, 50 ou 100mg/Kg p.o sobre a concentração das citocinas plasmáticas TNF- α e IL-1 β durante a endotoxemia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos adultos machos (6 semanas), da linhagem *Wistar*, pesando entre 200 e 300g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas-MG. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento (ração peletizada normoproteica) e foram mantidos à temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, em fotoperíodo definido de 12 horas, com as luzes acesas às 07:00. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Alfenas, sob o número de protocolo 39/2018.

3.2 DROGAS

Lipopolissacarídeo proveniente de *Escherichia coli* (sorotipo 026: B6 – Sigma Aldrich, USA), introduzido intraperitonealmente em dose única e diluído em NaCl 0,9%. Curcumina (Sigma, Brasil) introduzida por gavagem, 2 dias consecutivos, suspensa em carboximetilcelulose 0,5%, antes da aplicação de LPS. Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal LTDA), Cetoprofeno, Tribromoetanol (TBE-Sigma) e soro fisiológico 0,9% (Isofarma).

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Dose e horário da aplicação do LPS

Afim de estudar o efeito do LPS sobre o comportamento doente, a dose e o horário da aplicação do LPS foram selecionados amparados por estudos prévios de nosso laboratório. Selecionamos a dose de $500\mu\text{g/Kg}$ de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (026: B6 – Sigma Aldrich, USA), e os animais foram submetidos a testes comportamentais 2 horas após a aplicação. A administração do LPS ou do veículo foi realizada por via intraperitoneal, em dose única (SILVA, 2015; CABRAL, 2016; OLIVEIRA, 2016).

3.3.2 Pré-tratamento com curcumina

A curcumina apresentada na forma de pó, foi suspensa em carboximetilcelulose 0,5%, aplicada nas doses de 25, 50 ou 100mg/Kg (SORRENTI et al., 2018).

Após a diluição do fármaco foi administrado no animal: curcumina 25, 50 ou 100mg/Kg ou veículo (1ml/Kg), através de gavagem, por um período de 2 dias consecutivos, às 07:30h. No segundo dia, 1 hora após a última administração de curcumina, foi injetado intraperitonealmente LPS 500µg/Kg ou veículo (salina), e 2 horas após sua administração os testes foram realizados. Dessa forma, os animais foram divididos em 8 grupos como descrito no quadro 1 (SORRENTI, et al., 2018).

Quadro 1 - Grupos experimentais (pré-tratamento com curcumina / desafio imunológico com LPS).

Pré-tratamento (p.o) (2 dias)	Tratamento (i.p.) (2º dia)	Número de animais por grupo
Veículo (1ml/Kg)	Salina	8
Veículo (1ml/Kg)	LPS	8
curcumina (25mg/kg)	Salina	8
curcumina (25mg/kg)	LPS	8
curcumina (50mg/Kg)	Salina	8
curcumina (50mg/Kg)	LPS	8
curcumina (100mg/Kg)	Salina	8
curcumina (100mg/Kg)	LPS	8

Fonte: Da autora.

3.3.3 Dosagem de citocinas

Os animais foram anestesiados com TBE (250mg/kg; 0,1mL/g) e o sangue coletado por decapitação, foi submetido à centrifugação por um período de 15 minutos a 3500 rpm, a fim de obter o plasma para posterior dosagem das citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β),

usando o kit ELISA (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), de acordo com os protocolos recomendados pelo fabricante.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Campo Aberto

A avaliação deste teste permitiu verificar a atividade locomotora em roedores. Os animais foram colocados individualmente no centro de uma arena circular de acrílico, com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura, de fundo preto e filmados por 5 minutos para posterior análise. Em seguida, o aparato foi limpo com solução de etanol a 5% e a análise foi realizada automaticamente pelo software Ethovision XT versão 9.0 (WILCONSON et al., 2007; TOYAMA, 2012).

3.4.2 Nado Forçado

O teste do Nado Forçado é um modelo utilizado para analisar parâmetros preditivos à depressão (motivação) em roedores, de acordo com o método descrito por Porsolt e colaboradores (1978).

Para a realização do teste, utilizou-se um cilindro de acrílico, (com 24 cm de diâmetro e 60 cm de altura), completado com 40 cm de altura de água (25°C à 28°C). Este volume de água permitiu ao animal nadar (*swim*) ou boiar (*float*) sem encostar as patas ou a cauda no fundo do aparato. Um dia antes do teste, os animais foram submetidos ao nado por 15 minutos e após a sessão de natação eles foram secos com toalhas e colocados sob uma lâmpada (32°C) durante 15-30 minutos. No dia do teste (24 horas após a adaptação), os animais foram colocados no cilindro por 5 minutos e o comportamento foi registrado através de filmagem, no qual foram avaliados os parâmetros de imobilidade (*floating*), nado (*swimming*) e escalada (*climbing*) (DETKE et al., 1995).

3.4.3 Interação Social

O teste de interação social baseia-se no confronto entre o animal a ser testado (animal residente) e um indivíduo da mesma espécie que tenha, porém, com idade e peso inferior (no mínimo 100g a menos - animal intruso). Ambos os animais foram colocados na arena de campo aberto, e a interação entre residente e intruso foi registrada por 10 minutos através de uma câmera filmadora. Para prevenir que o comportamento exploratório atrapalhe a expressão da sociabilidade, o animal residente foi habituado ao aparato por 3 dias consecutivos, anteriores ao dia do teste, durante um período de 10 minutos.

No dia do teste, as duplas foram avaliadas de acordo com o tempo de interação social total, ou seja, exploração anogenital (se eles seguem), imitam ou montam no animal intruso (ato de colocar as patas dianteiras sobre o animal). Os vídeos foram avaliados, e o tempo total de interação entre residente e intruso foram contados (DER-AVAKIAN; MARKOU, 2014).

3.4.4 Ingestão Alimentar

Anteriormente ao dia do teste os animais foram alocados em caixas individuais e tiveram livre acesso à água e comida. No dia do teste, antes de receber o tratamento, retirou-se a ração por 2 horas. Posteriormente à essa restrição alimentar, foi oferecida aos animais ração peletizada previamente pesada e o padrão de ingestão alimentar foi monitorado durante 24 horas, por meio de pesagem da ração nos tempos de 2, 4, 6 e 24 horas após sua reintrodução (RORATO *et al.*, 2012).

3.5 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL POR TELEMETRIA

O teste de telemetria foi realizado em animais submetidos ao pré-tratamento p.o. com veículo ou curcumina (25, 50 ou 100mg/Kg) e posteriormente desafiados imunologicamente com LPS, permitindo-nos avaliar se a droga em estudo participa da modulação da febre.

Cada animal recebeu um transmissor de biotelemetria (probe) (série 4000 E-Mitter; Mini Mitter, Bend, OR), implantado na cavidade peritoneal que transmitiu sinais, a cada um minuto, para uma placa receptora acoplada a um computador. O acesso a cavidade peritoneal foi possível por meio de laparotomia de aproximadamente 2cm no abdômen, com os animais sob efeito de anestésico injetável (tribromoetanol 250mg/Kg - TBE, i.p.; Sigma Aldrich, Brasil). Após o implante do transmissor, a incisão foi fechada por meio de aproximadamente três pontos internos feitos no tecido muscular e três externos feitos no tecido epitelial, em seguida foi administrado antibiótico (Pentabiótico; Fort Dodge, Brasil). Os animais foram mantidos em uma caixa com temperatura controlada (32° C) até a completa recuperação da anestesia. Posteriormente, os animais ficaram isolados em gaiolas individuais com livre acesso à água e comida (CLEMENT; MILLS; BROCKWAY, 1989).

Após a inserção do probe e completa recuperação dos animais (7 dias após cirurgia), eles foram posicionados sobre uma placa receptora (Data Sciences) para coleta da temperatura interna e receberam administração de salina ou LPS. As informações foram coletadas durante 24 horas e repassadas para o software (*Vital View, Mini Mitter*), onde os dados estavam armazenados, sendo que somente os animais que se apresentaram com temperatura interna inferior a 37,5°C foram submetidos ao teste.

Para determinação da temperatura basal, foi calculado a média das temperaturas aferidas 30 minutos antes da primeira administração, e a diferença entre a temperatura basal média e a temperatura obtida a cada intervalo, para obtenção da variação de temperatura (delta) (CRUNFLI; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014; SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015).

Figura 7 - Receptor de telemetria (*Data Science*) conectado ao computador.



Fonte: OLIVEIRA, 2016.

Figura 8 - Transmissor de telemetria e demonstração do programa utilizado para a coleta de dados de temperatura.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2016.

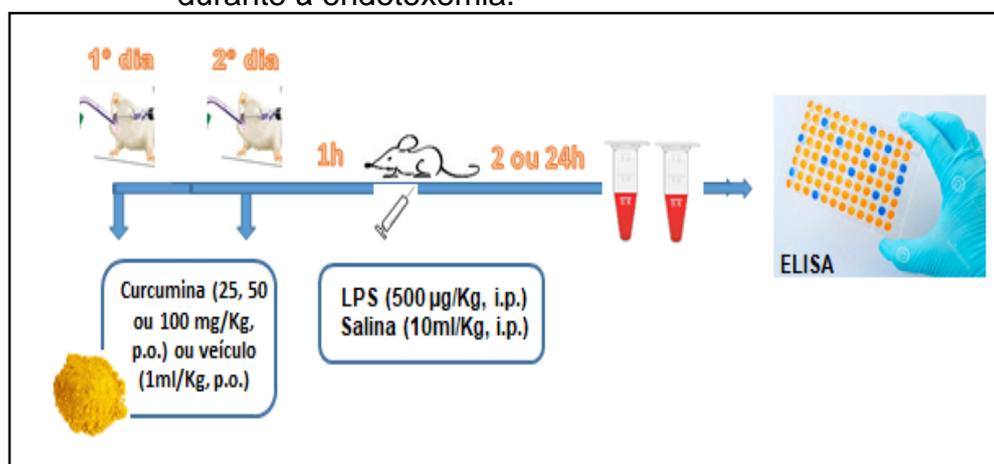
Nota: A) Transmissor de temperatura (probe). B) Demonstração do programa utilizado para coleta dos dados de temperatura, os quais são exibidos graficamente no monitor e armazenados em arquivo digital.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.6.1 Efeito do pré-tratamento com curcumina sobre o comportamento doentio

Após selecionarmos a dose e o horário de aplicação de LPS (500µg/Kg, i.p.), iniciamos o pré-tratamento com a curcumina. Os animais receberam através de gavagem, veículo (1ml/Kg) ou curcumina (25, 50 ou 100mg/Kg), por um período de 2 dias consecutivos. No segundo dia, aplicamos intraperitonealmente o LPS, uma

Figura 10 - Protocolo experimental do efeito do pré-tratamento com curcumina sobre a concentração plasmática de citocinas durante à endotoxemia.

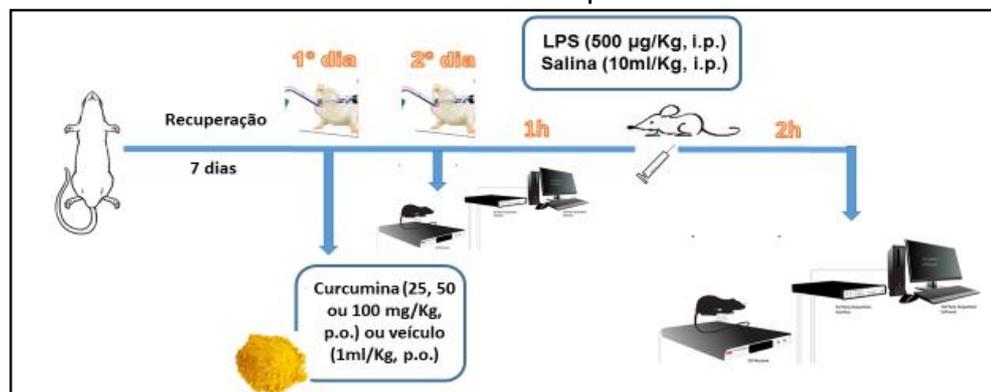


Fonte: Da autora.

3.6.3 Efeito do pré-tratamento com curcumina na febre induzida pela endotoxemia

Os animais passaram por um procedimento cirúrgico para o implante do probe, afim de verificarmos sua temperatura interna e após o período de recuperação (7 dias), eles receberam através de gavagem, curcumina (25, 50 ou 100mg/Kg) ou veículo (1ml/Kg), por um período de dois dias. No segundo dia, uma hora após a última dose de curcumina, aplicamos LPS e duas horas após, colocamos as caixas contendo os animais (alocados individualmente) sob receptores de telemetria conectados a um computador para registro da temperatura interna-. O registro foi realizado durante 8 horas (Figura 11).

Figura 11 - Protocolo experimental do efeito do pré-tratamento com curcumina na febre induzida pela endotoxemia.



Fonte: Da autora.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando-se o programa do software GraphPad versão 8.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para a comparação dos efeitos do pré-tratamento (p.o. com curcumina ou veículo) e o desafio imunológico (tratamento com solução salina ou com LPS) foram utilizados a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey, para a avaliação dos parâmetros comportamentais e dosagem de citocinas. Quanto a análise da termorregulação, os fatores pré-tratamento (p.o. com curcumina ou veículo), desafio imunológico (tratamento com salina ou com LPS) e tempo foram utilizados a análise de variância (ANOVA) de três vias, seguida pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância foi baseado em valores de p inferiores à 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM CURCUMINA NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA

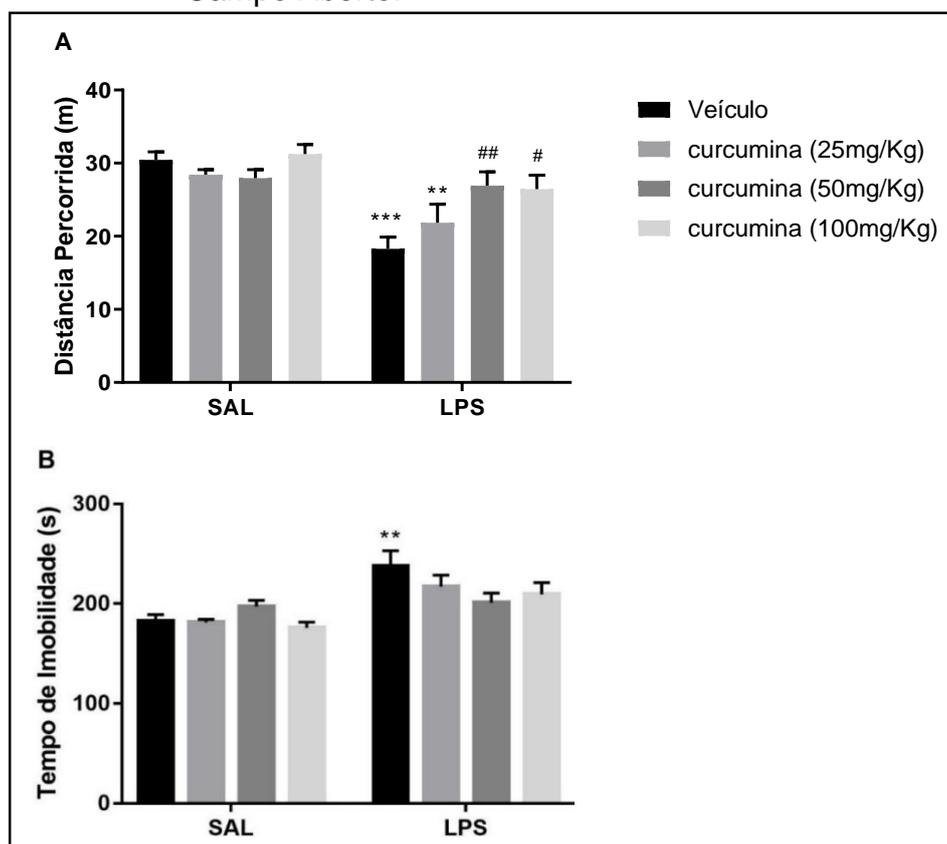
4.1.1 Campo Aberto

A seguir, a figura 12, mostra o desempenho comportamental no teste de campo aberto de ratos que foram pré-tratados p.o. com veículo ou curcumina nas doses de (25, 50 ou 100mg/Kg, p.o.) e posteriormente receberam uma injeção i.p. de veículo ou LPS (500µg/Kg).

Nos animais do grupo veículo+LPS, observou-se uma redução da distância percorrida ($p < 0,001$, figura 12A) e aumento do tempo de imobilidade ($p < 0,01$, figura 12B) no aparato, em relação ao grupo controle.

Podemos notar ainda, que após 2 horas do tratamento com LPS i.p., os animais pré-tratados com curcumina (25mg/Kg, p.o.) apresentaram redução na distância percorrida ($p < 0,01$, figura 12A) quando comparado ao grupo controle (veículo+SAL) e dessa forma, podemos notar que a dose de 25mg/Kg da droga, não foi capaz de prevenir o comportamento doentio induzido pelo LPS. Contudo, ao pré-tratar os animais com curcumina nas doses de (50 ou 100mg/Kg, p.o), nota-se uma prevenção deste parâmetro, com aumento significativo da distância percorrida ($p < 0,01$ e $p < 0,1$, figura 12A) respectivamente quando comparado ao grupo (veículo+LPS). Não observamos diferença significativa entre os grupos pré-tratados com curcumina (em todas as doses testadas) e o grupo controle, no parâmetro tempo de imobilidade (figura 12B) (Análise estatística – Tabela 1).

Figura 12 - Efeitos do pré-tratamento com curcumina durante à endotoxemia em animais submetidos ao teste de Campo Aberto.



Fonte: Da autora

Nota: Em A temos a distância percorrida (m), em B, o tempo de imobilidade (s) em animais pré-tratados com veículo ou curcumina (25, 50 ou 100mg/Kg), p.o., e posteriormente submetidos a endotoxemia. Estatística: ANOVA = 2 vias, com pós teste de Tukey (n=8). ** p<0,01 e *** p<0,001 comparados ao grupo controle, # p<0,01 e ## p<0,01 comparados ao grupo veículo+LPS.

Tabela 1 - Análise de variância de duas vias no Teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Distância percorrida	F (3, 55) = 3,236 P 0,0290	F (1, 55) = 29,12 P<0,0001	F (3, 55) = 4,212 P=0,0094
Tempo de imobilidade	F (3, 55) = 1,145 P=0,3390	F (1, 55) = 22,71 P<0,0001	F (3, 55) = 2,537 P=0,0661

Fonte: Da autora.

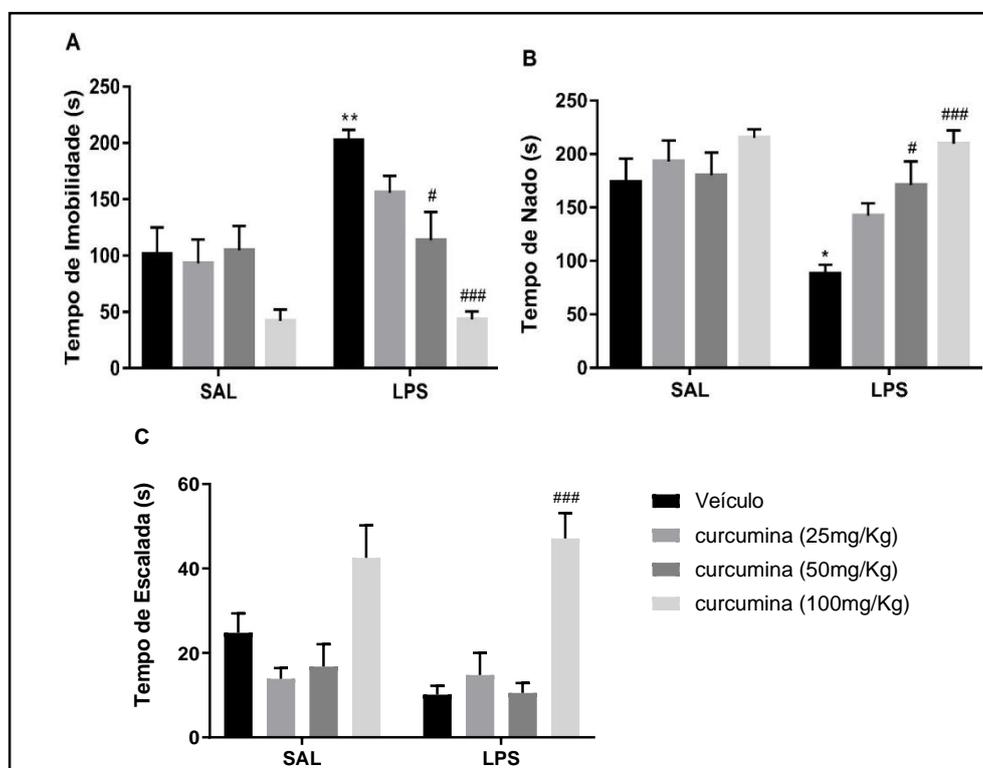
4.1.2 Nado Forçado

A seguir, a figura 13, permite a avaliação da performance comportamental dos ratos machos adultos submetidos ao teste de nado forçado em animais submetidos ao pré-tratamento p.o. com veículo ou curcumina, 2 horas após tratamento i.p. com salina ou LPS. Nos animais do grupo veículo+LPS, observou-se um aumento do tempo de imobilidade ($p < 0,01$, figura 13A) e redução no tempo de nado ($p < 0,1$, figura 13B) quando comparados ao grupo controle.

O parâmetro de tempo de imobilidade permitiu-nos observar, que apenas os animais que receberam o pré-tratamento com a curcumina (50 e 100mg/Kg, p.o.), antes da aplicação do LPS, apresentaram redução no tempo de imobilidade ($p < 0,1$ e $p < 0,001$, figura 13A) e aumento no tempo de nado ($p < 0,1$ e $p < 0,001$, figura 14B) em relação ao grupo veículo+LPS, reforçando que apenas nestas doses, o fármaco foi capaz de atenuar/prevenir o comportamento semelhante ao depressivo.

Quanto ao parâmetro de escalada, observamos uma diferença significativa apenas nos animais do grupo curcumina (100mg/Kg) +LPS ($< 0,001$) em relação ao controle, onde um aumento da escalada reforça o efeito desta dose (Análise estatística – Tabela 2

Figura 13 - Efeitos do pré-tratamento com curcumina durante a endotoxemia em animais submetidos ao teste de Nado Forçado.



Fonte:

Da autora

Nota:

Observamos em A temos o tempo de imobilidade (s), em B, o tempo de nado (s), e em C, o tempo de escalada (s) em animais pré-tratados com veículo ou curcumina (25, 50 ou 100 mg/Kg), p.o., e posteriormente submetidos a endotoxemia. Estatística: ANOVA = 2 vias, com pós teste de Tukey (n=8). * $p < 0,1$ e ** $p < 0,01$ comparados ao grupo controle, # $p < 0,1$ e ### $p < 0,001$ comparados ao grupo veículo+LPS.

Tabela 2 - Análise de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Tempo de Imobilidade	F (3, 56) = 13,38 P<0,0001	F (1, 56) = 11,65 P=0,0012	F (3, 56) = 3,424 P=0,0232
Tempo de Nado	F (3, 56) = 8,036 P=0,0002	F (1, 56) = 10,18 P=0,0023	F (3, 56) = 2,563 P=0,0638
Tempo de Escalada	F (3, 56) = 18,81 P<0,0001	F (1, 56) = 1,246 P=0,2691	F (3, 56) = 1,518 P=0,2199

Fonte: Da autora.

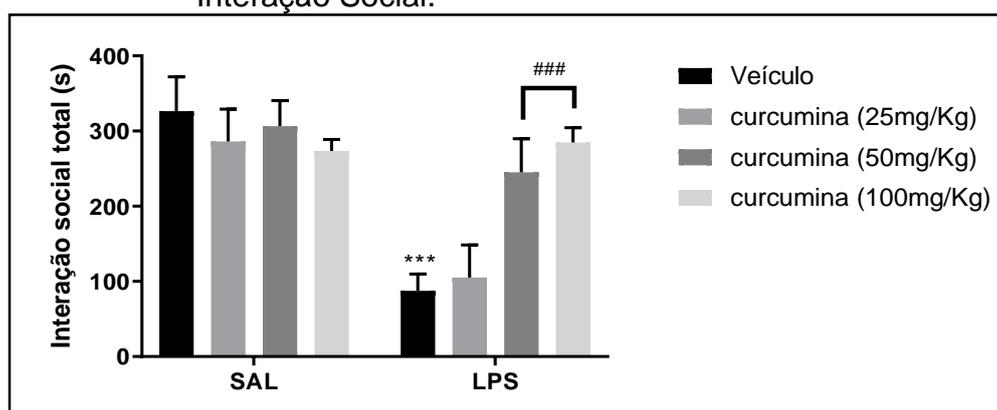
4.1.3 Interação Social

A seguir, a figura 14, permite-nos avaliar o tempo total de interação social em ratos que foram pré-tratados com veículo ou curcumina nas doses de (25, 50 ou 100mg/Kg, p.o.) e posteriormente receberam uma injeção i.p. de veículo ou LPS.

Observa-se que os animais do grupo veículo+LPS apresentaram redução no tempo de interação total ($p < 0.001$) quando comparados ao grupo controle.

É notável ainda, que após 2 horas do tratamento com LPS i.p., os animais pré-tratados com curcumina nas doses de (50 e 100mg/Kg, p.o.), apresentaram um aumento ($p < 0,001$) do tempo de interação social, quando comparados aos animais do grupo V+LPS (Análise estatística – Tabela 3).

Figura 14 - Efeitos do pré-tratamento com curcumina durante a endotoxemia em animais submetidos ao teste de Interação Social.



Fonte: Da Autora

Nota: Tempo de interação social total (s) no teste de interação social em animais pré-tratados com veículo ou curcumina (25, 50 ou 100 mg/Kg), p.o., e posteriormente submetidos a endotoxemia. Estatística: ANOVA = 2 vias, com pós teste de Tukey ($n=8$). *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle, ### $p < 0,001$ comparados ao grupo veículo+LPS.

Tabela 3: Análise de variância de duas vias no Teste de Interação Social, em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Interação Total	F (3, 54) = 16,85 P<0,0001	F (1, 54) = 117,7 P<0,0001	F (3, 54) = 27,42 P<0,0001

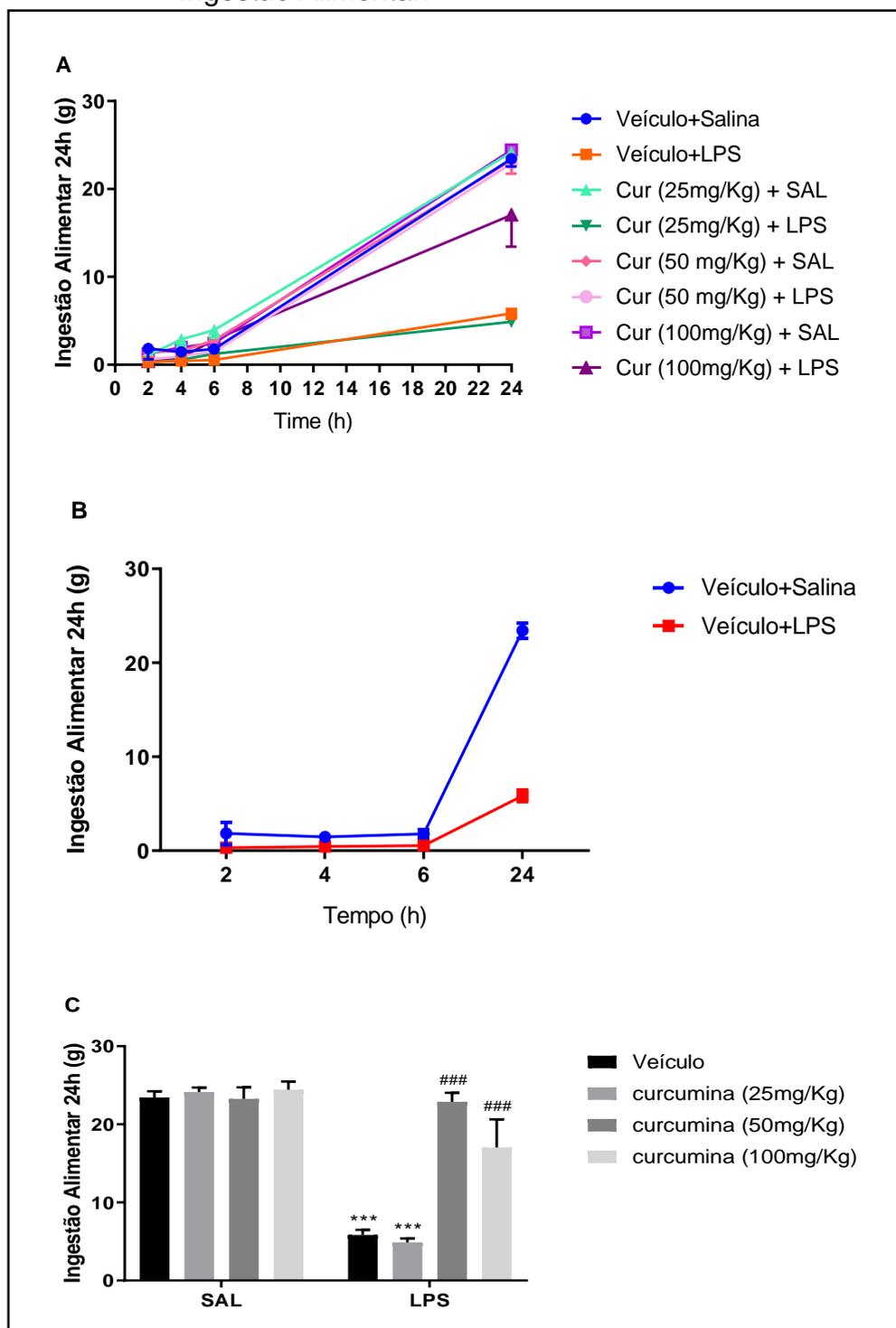
Fonte: Da autora.

4.1.4 Ingestão Alimentar

A seguir, a figura 15A, corresponde à avaliação da ingestão alimentar dos animais submetidos ao pré-tratamento com curcumina e posteriormente à endotoxemia.

Notou-se que os animais do grupo veículo+LPS apresentaram uma redução da ingestão alimentar ($p < 0,001$, figura 15B), 24 horas após o desafio imunológico, quando comparados ao grupo controle. Essa redução também foi observada em animais do grupo curcumina (25mg/Kg) +LPS ($p < 0,001$, figura 15C), reforçando que a dose de (25mg/Kg) do fármaco, não foi capaz de prevenir a diminuição da ingestão alimentar induzida pelo LPS. Contudo, nos animais dos grupos curcumina (50mg/Kg)+LPS e curcumina (100mg/Kg)+LPS, observou-se um aumento significativo da ingestão alimentar após 24 horas ($p < 0,001$ para ambos, figura 15C) em relação ao grupo tratado com veículo+LPS (Análise estatística – Tabela 4).

Figura 15 - Efeitos do pré-tratamento com curcumina durante a endotoxemia em animais submetidos ao teste de Ingestão Alimentar.



Fonte: Da autora.

Nota: Em A temos a ingestão alimentar durante a endotoxemia. Em B, a ingestão alimentar em 24 horas após o desafio imunológico, em animais pré-tratados p.o. com veículo. Em C, a ingestão alimentar em 24 horas após o desafio imunológico com LPS em animais pré-tratados com veículo ou curcumina (cur) (25, 50 ou 100 mg/Kg), p.o. Estatística: ANOVA = 2 vias, com pós teste de Tukey (n=8) ***p<0,001 comparados ao grupo controle, ###p<0,001 comparados ao grupo veículo+LPS.

Tabela 4 - Análise de variância de duas vias no Teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (Pré-tratamento) e submetidos à injeção i.p. de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Ingestão Alimentar (g) 24 horas	F (3, 55) = 18,41 P<0,0001	F (1, 55) = 120,5 P<0,0001	F (3, 55) = 19,45 P<0,0001

Fonte: Da autora.

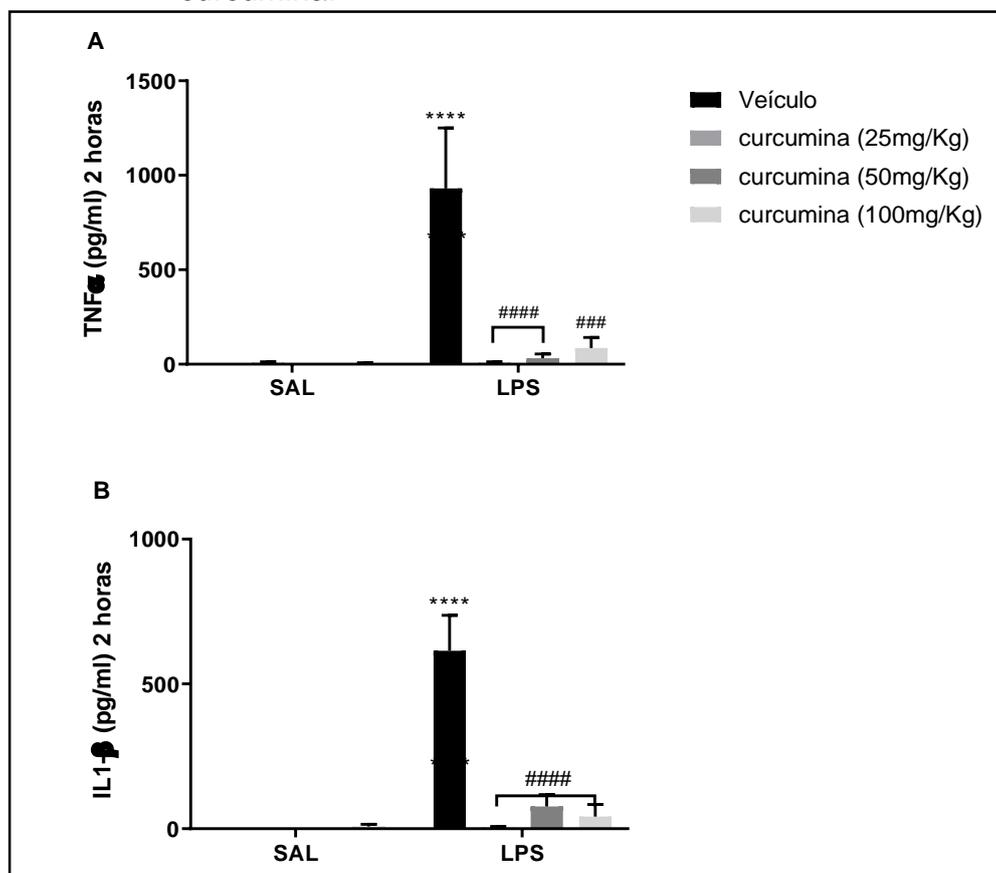
4.2 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM CURCUMINA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PLASMÁTICAS EM 2 HORAS DURANTE À ENDOTOXEMIA

A seguir, a figura 16, demonstra a concentração plasmática de citocinas, TNF- α e IL1- β , 2 horas após o desafio imunológico com LPS, em animais que foram pré-tratados com veículo ou curcumina nas doses de (25, 50 ou 100mg/Kg, p.o.).

Observamos que os animais do grupo veículo+LPS apresentaram um aumento significativo das citocinas TNF- α ($p<0,0001$, figura 16A) e IL-1 β ($p<0,0001$, figura 16B) quando comparados ao grupo controle.

Podemos notar ainda, que após 2 horas do tratamento com LPS, o pré-tratamento com curcumina em todas as doses testadas preveniu o aumento das citocinas TNF- α ($p<0,0001$, $p<0,0001$ e $p<0,001$ respectivamente, figura 16A) e da IL1- β ($p<0,0001$ para todos, figura 16B), quando comparado ao grupo veículo+LPS (Análise estatística – Tabela 5).

Figura 16 - Nível de concentração plasmática de TNF- α e IL-1 β 2 horas após a aplicação de LPS em animais pré-tratados com curcumina.



Fonte:

Da autora.

Nota:

Em A, temos o nível de concentração plasmática de TNF- α , e em B, o nível de concentração plasmática de IL1- β 2 horas durante a endotoxemia, em animais pré-tratados com veículo ou curcumina (25, 50 ou 100 mg/Kg, p.o.). Estatística: ANOVA = 2 vias, com pós teste de Tukey (n=8) ****p<0,0001 comparados ao grupo controle, ###p<0,001, ####p<0,0001 comparados ao grupo veículo+LPS.

Tabela 5 - Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico), em relação às concentrações de citocinas plasmáticas 2 horas durante à endotoxemia.

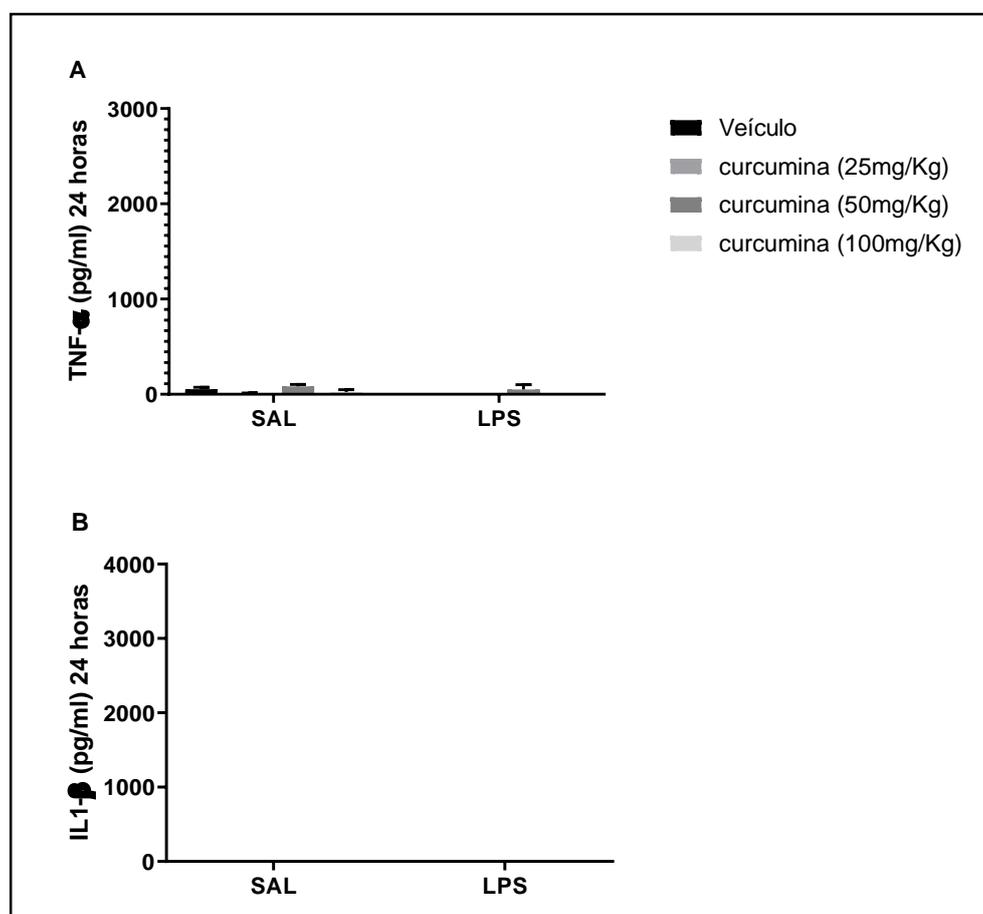
Dosagem de citocinas	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
IL-1 β	F (3, 52) = 17,71 P<0,0001	F (1, 52) = 26,85 P<0,0001	F (3, 52) = 18,02 P<0,0001
TNF- α	F (3, 54) = 7,165 P=0,0004	F (1, 54) = 9,697 P=0,0030	F (3, 54) = 7,298 P=0,0003

Fonte: Da autora

4.3 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM CURCUMINA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PLASMÁTICAS EM 24 HORAS DURANTE A ENDOTOXEMIA

A seguir, a figura 17, apresenta a concentração plasmática das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , 24 horas após a administração de LPS, em animais que receberam o pré-tratamento com curcumina nas doses de (25, 50 ou 100mg/Kg, p.o.). Não observamos diferença significativa entre os grupos testados quando comparados ao grupo controle ou veículo+LPS (Análise estatística – Tabela 6). Este dado reafirma o que já é explícito na literatura, a qual nos traz que os efeitos do LPS se tornam imperceptíveis 24 horas após sua administração.

Figura 17 - Nível de concentração plasmática de TNF- α e IL-1 β 24 horas durante à endotoxemia de animais pré-tratados com curcumina.



Fonte: Da autora.

Nota: Em A, temos o nível de concentração plasmática de TNF- α , e em B, o nível de concentração plasmática de IL1- β 24 horas durante a endotoxemia, em animais pré-tratados com veículo ou curcumina (25, 50 ou 100 mg/Kg, p.o.). Estatística: ANOVA = 2 vias, com pós teste de Tukey (n=3).

Tabela 6 - Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio Imunológico), em relação às concentrações de citocinas plasmáticas 24 horas durante à endotoxemia.

Dosagem de citocinas	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
IL-1 β	F (3, 16) = P=-1,#IND	F (1, 16) = P=-1,#IND	F (3, 16) = P=-1,#IND
TNF- α	F (3, 16) = 3,236 P=0,0501	F (1, 16) = 3,463 P=0,0812	F (3, 16) = 0,3701 P=0,7756

Fonte: Da autora.

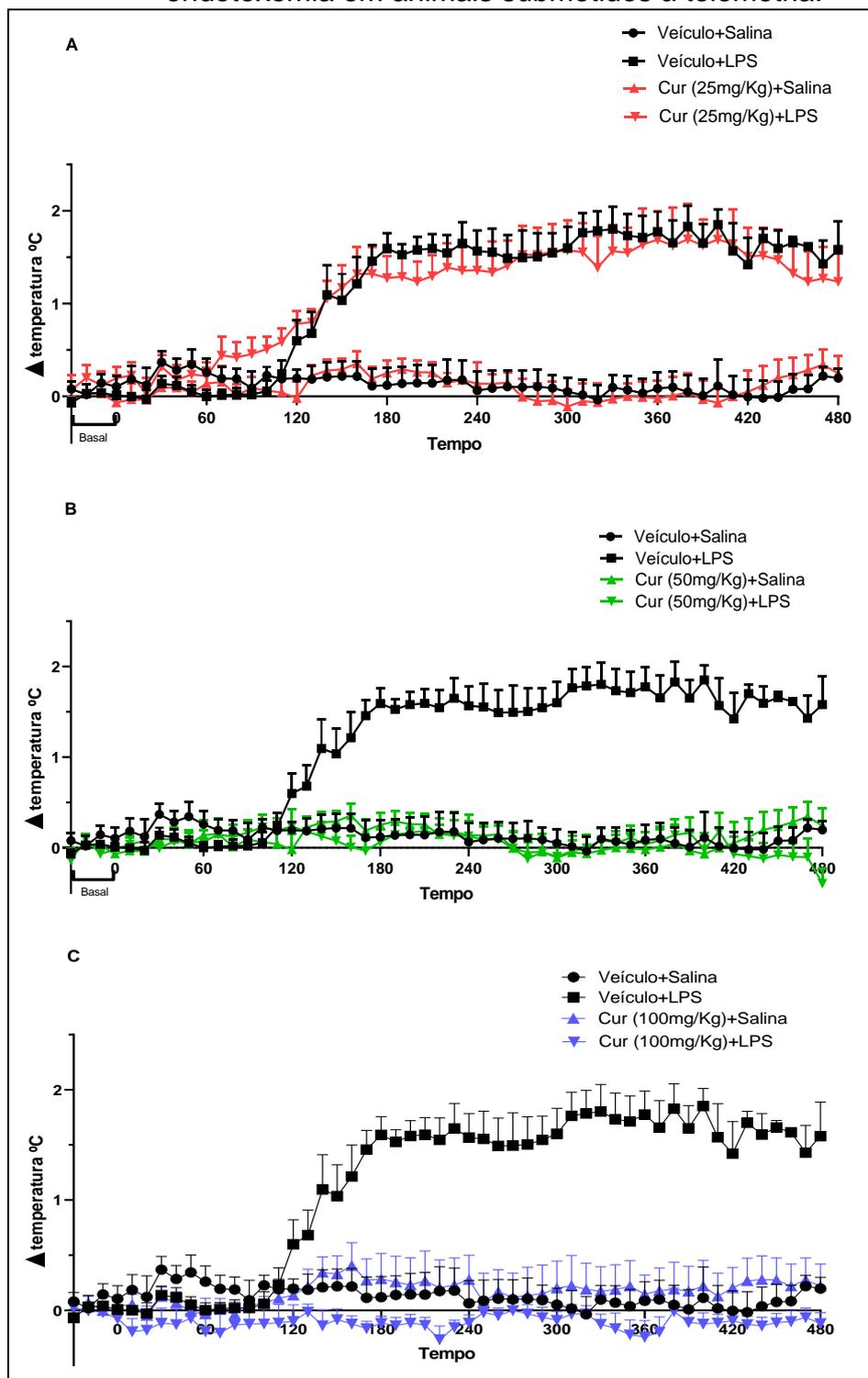
4.4 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM CURCUMINA SOBRE AS ALTERAÇÕES TERMORREGULATÓRIAS DURANTE A ENDOTOXEMIA

A seguir, a figura 18, demonstra a avaliação do delta da temperatura corporal em animais endotoxêmicos submetidos ao pré-tratamento (p.o.) com veículo ou curcumina nas doses de 25, 50 ou 100mg/Kg.

Observamos nas figuras 18A, 18B e 18C que os animais do grupo veículo+LPS apresentaram o desenvolvimento da resposta febril, 170 minutos após a aplicação do LPS ($p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente), quando comparado ao grupo controle. Uma resposta semelhante a esta, também pôde ser observada em ratos que receberam o pré-tratamento com curcumina na dose de 25mg/Kg, 140 minutos após a aplicação da endotoxina ($p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle, ou seja, esta dose não foi capaz de prevenir a febre).

Contudo, notamos que o pré-tratamento com curcumina nas doses de 50 e 100mg/Kg, foi capaz de prevenir a febre induzida pelo LPS nestes animais. Isso pode ser constatado ao compararmos estes grupos (cur 50+LPS e cur 100+LPS) ao grupo V+LPS (figuras 18B e 18C) ($p < 0,01$ para ambos) (Análise estatística – Tabela 7).

Figura 18 - Efeitos do pré-tratamento com curcumina durante a endotoxemia em animais submetidos à telemetria.



Fonte: Da autora,

Nota: Em A, temos o efeito do pré-tratamento com curcumina (25mg/Kg) sobre o delta de temperatura. Em B, temos o efeito do pré-tratamento com curcumina (50mg/Kg) sobre o delta de temperatura. Em C, temos o efeito do pré-tratamento com curcumina (100mg/Kg) sobre o delta de temperatura. Estatística: ANOVA = 2 vias, com pós teste de Tukey (n=6-7) *(p<0,1), **(p<0,01) comparados ao grupo controle, ##p<0,01, ###p<0,001 comparados ao grupo veículo+LPS.

Tabela 7 - Análise de variância de três vias em grupos pré-tratados com veículo ou curcumina (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio Imunológico) em relação às alterações termorregulatórias.

Doses	25mg/Kg	50mg/Kg	100mg/Kg
Tempo	F (51, 1144) = 9,231 P<0,0001	F (51, 1144) = 4,440	F (51, 1144) = 5,166 P<0,0001
Curcumina	F (1, 1144) = 0,9048 P=0,3417	F (1, 1144) = 550,8 P<0,0001	F (1, 1144) = 637,7 P<0,0001
LPS	F (1, 1144) = 1194 P<0,0001	F (1, 1144) = 400,7 P<0,0001	F (1, 1144) = 227,1 P<0,0001
Tempo x curcumina	F (51, 1144) = 0,2122 P>0,9999	F (51, 1144) = 4,316 P<0,0001	F (51, 1144) = 3,275 P<0,0001
Tempo x LPS	F (51, 1144) = 10,21 P<0,0001	F (51, 1144) = 5,099 P<0,0001	F (51, 1144) = 4,353 P<0,0001
curcumina x Lps	F (1, 1144)=0,06143 P=0,8043	F (1, 1144) = 484,2 P<0,0001	F (1, 1144) = 718,0 P<0,0001
Tempo x curcumina x LPS	F (51, 1144)=0,5947 P=0,9896	F (51, 1144) = 6,101 P<0,0001	F (51, 1144) = 6,535 P<0,0001

Fonte: Da autora

5 DISCUSSÃO

5.1 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM CURCUMINA SOBRE AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA

O comportamento doentio representa uma estratégia altamente regulada e adaptativa do organismo, visando promover a recuperação deste quadro. O LPS é frequentemente utilizado em diferentes estudos, para estimular o sistema imune inato de maneira semelhante a uma infecção bacteriana. Diante disso, vários trabalhos têm demonstrado que a sua administração sistêmica ou no cérebro (ventrículo lateral) culmina em alterações imunológicas, fisiológicas, termorregulatórias e comportamentais (DANTZER *et al.*, 2008; KRISHNADAS; CAVANAGH, 2012; OLIVEIRA, 2016; SILVA, 2015).

Dentre as alterações comportamentais podemos elencar: letargia, redução da atividade locomotora/exploratória e do comportamento social, anorexia, perda de peso, anedonia, comportamento tipo-depressivo e aumento de sensibilidade à dor, as quais em conjunto, são denominadas comportamento doentio. Estas respostas comportamentais aliadas à resposta febril e às alterações neuroendócrinas, são mediadas pela ativação do sistema imunológico, representando uma estratégia altamente organizada para combater a infecção no hospedeiro (de PAIVA *et al.*, 2010; HART, 1988; KENT *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 2013).

O comportamento doentio é caracterizado como um estado motivacional, onde o animal encontra-se empenhado a evitar o gasto energético, proporcionando uma resposta imune eficaz e desfavorecendo o patógeno. Alguns dos sintomas observados nos animais submetidos ao desafio imunológico com LPS, são semelhantes aos sintomas clinicamente relevantes na depressão e ansiedade em seres humanos (HUANG; WYNNE, 2008; O'CONNOR; LAWSON; ANDRÉ, 2009).

Os comportamentos semelhantes a depressão, bem como as alterações na locomoção e na ingestão alimentar e febre podem ser observados no comportamento doentio. A literatura nos traz que os modelos comportamentais são boas ferramentas para constatar o curso e a gravidade do comprometimento imunológico dos animais ao receberem dose sistêmica de LPS. É sabido também

que os testes utilizados em nosso estudo como: campo aberto, nado forçado, interação social, ingestão alimentar e telemetria, são descritos em trabalhos anteriores como metodologias eficazes para estudar o efeito desta endotoxina (DANTZER, 2004; GRANGER *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2007).

Tomaz *et al* (2013), demonstraram que camundongos que receberam a dose de 500µg/Kg de LPS, i.p., e posteriormente submetidos ao teste de campo aberto e nado forçado, duas horas após a aplicação do mesmo, apresentaram uma redução da capacidade exploratória/locomotora e aumento do tempo de imobilidade, caracterizando um quadro de comportamento doentio. Este resultado corrobora com os achados de um estudo semelhante, desenvolvido por Murray e colaboradores (2011), onde constataram que camundongos tratados com a mesma dose de LPS também apresentaram redução da locomoção no teste de campo aberto.

A pesquisa realizada por Cabral (2016), também evidenciou a redução na atividade locomotiva e exploratória e maior tempo de imobilidade nos animais submetidos ao desafio imunológico com LPS (200, 500, 1000µg/Kg), corroborando com os achados de Mello *et al* (2013), que também demonstraram que camundongos tratados com LPS na dose de 500µg/Kg, desempenhavam menor locomoção no aparato de campo aberto e maior tempo de imobilidade no teste de nado forçado.

Estudos anteriores de nosso laboratório, utilizaram uma curva dose-resposta para avaliar as diferentes doses de LPS (100, 200, 500, 1000 e 2000µg/Kg) em ratos e camundongos, demonstrando que esta endotoxina possui a capacidade de reduzir o número de cruzamentos totais no teste de campo aberto e da sociabilidade no teste de interação social, provocar a anorexia, bem como aumentar o tempo de imobilidade nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda e induzir febre, fortalecendo os achados da literatura (de PAIVA, 2013; OLIVEIRA, 2016; PAULA JUNIOR, 2015).

Diante destes achados e de estudos prévios realizados em nosso laboratório, baseamos a escolha de nossa dose de LPS. Selecionamos a dose de 500 µg/Kg, afim de ativar o sistema imune e desencadear o comportamento doentio e a resposta febril nos animais analisados. Ademais, a escolha da via de administração i.p. se deve ao fato de que a mesma pode influenciar tanto na

comunicação neuroimune quanto na termorregulação, induzindo as alterações comportamentais já mencionadas, além de permitir a rápida entrada do LPS na corrente sanguínea (BASSI *et al.*, 2012; de PAIVA *et al.*, MUNFORD, 2010; NOGUEIRA DE PAIVA, 2013; ORLANDI *et al.*, 2015; O'REILLY; SILVA, 2015; VANDER; KLUGER, 1988; YIRMYA, 1996).

Trabalhos anteriores sugerem que o ápice da resposta comportamental, após o desafio imunológico com LPS, ocorre após 2 horas, sendo esta atenuada conforme o decorrer do tempo, tornando-se imperceptível em 24 horas após a aplicação do mesmo. Desta forma, 2 horas após a administração de salina ou LPS, os testes comportamentais foram realizados nos ratos *Wistar* machos adultos (CHAOULOFF; DURAND; MORMEDE, 1997; de PAIVA *et al.*, 2010; GIUSTI-PAIVA, 2015; NOLDER; SHOTZ, 2007; ORLANDI *et al.*, 2015; SILVA, 2015).

Em nosso trabalho os animais do grupo veículo+LPS apresentaram uma redução na capacidade locomotora/exploratória no teste de campo aberto e da sociabilidade no teste de interação social, redução da ingestão alimentar e aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado, quando comparados ao grupo controle (veículo+salina), permitindo-nos constatar a capacidade do LPS, nesta dose, de produzir respostas características do comportamento doentio, conforme anteriormente enfatizado nos achados da literatura e de nosso laboratório (OLIVEIRA, 2016; TOWNSEND *et al.*, 2014).

Há na literatura um significativo número de trabalhos científicos cujo objetivo é verificar a eficácia terapêutica da curcumina em diferentes atividades farmacológicas, contudo são escassos os trabalhos que abordem conjuntamente este fitoterápico e a endotoxemia, induzida pelo LPS. Diante disso, nosso trabalho fez-se importante, permitindo-nos investigar seus efeitos no comportamento doentio (ARAUJO; LEON, 2011; KULKANI *et al.*, 2008; SOMAPAMIT *et al.*, 2009; SEEHOFER *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2012).

Nossos resultados revelaram que a curcumina na dose de 25 mg/Kg, antes da aplicação i.p. de LPS, não foi capaz de prevenir o comportamento doentio em nenhum dos aparatos testados, contudo, quando o pré-tratamento foi realizado com as doses de 50 ou 100 mg/Kg, p.o., foi possível observar a prevenção do comportamento doentio.

Berbigier *et al* (2017), demonstraram que o pré-tratamento por 28 dias com curcumina, na dose de 50 mg/Kg, através de gavagem, preveniu a diminuição da atividade locomotora induzida pelo estresse crônico, moderado e imprevisível. Corroborando com este estudo, Sorrenti e colaboradores (2018), mostraram um resultado semelhante em animais que receberam esta mesma dose de curcumina (por um curto período de tempo).

Em um modelo de Parkinson induzido por LPS, onde observamos um comprometimento da função locomotora/exploratória no teste de campo aberto, a curcumina administrada p.o. na dose de 100 mg/Kg, foi capaz de prevenir este quadro, o trabalho relacionou este resultado aos possíveis efeitos neuroprotetores desta droga na substância negra (MANSOURI *et al.*, 2012).

Os nossos resultados no teste de campo aberto corroboram com os estudos citados anteriormente, pois foi possível observar a prevenção da diminuição da distância percorrida induzida pelo LPS, em animais que receberam o pré-tratamento com curcumina nas doses de 50 e 100mg/Kg, (p.o.), durante 2 dias consecutivos.

Quanto ao comportamento tipo-depressivo, Pires e colaboradores (2013), demonstraram o papel da curcumina em modelos animais de depressão, ressaltando seu efeito antidepressivo e a sua atividade serotoninérgica. Xu *et al* (2005), demonstraram que o uso a longo prazo de curcumina nas doses de (2,5, 5 ou 10mg/Kg/dia), foi capaz de diminuir significativamente o tempo de imobilidade dos animais, submetidos ao teste de nado forçado após o desafio imunológico com LPS, desenvolvendo efeito semelhante ao da imipramina 10mg/Kg, i.p.

Similarmente, Yu e colaboradores (2002), observaram que após 14 dias de pré-tratamento em camundongos com curcumina nas doses de (140, 280 ou 560mg/Kg/dia), através de gavagem e submetidos a endotoxemia, apresentaram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e no nado forçado. Curiosamente, este efeito foi superior ao tratamento com fluoxetina na dose de 20mg/Kg, via oral.

Achados de Wang e colaboradores (2008), apontam que camundongos que receberam p.o. as doses de 5 ou 10mg/Kg de curcumina, 45 minutos antes do teste do nado forçado, apresentaram redução significativa do tempo de imobilidade quando comparados aos animais tratados apenas com veículo. Xu e colaboradores

(2015), realizaram o teste de nado forçado em animais bulbectomizados, que receberam esta droga doses de (1,25, 2,5, 5 ou 10mg/kg), p.o., por 14 dias e constataram a diminuição do tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Ainda neste mesmo estudo, os autores relataram que os efeitos das doses de 5 e 10mg/Kg de curcumina, foram similares ao desempenhado por animais bulbectomizados e tratados com imipramina na dose de 10mg/Kg. Berbigier e colaboradores (2017), também constataram que o tempo de imobilidade encontrava-se reduzido no teste de nado forçado em animais pré-tratados com curcumina na dose de 50mg/Kg, p.o., e posteriormente submetidos ao estresse crônico, moderado e imprevisível.

Estes dados nos permitem sugerir uma curva dose-dependente para a relação entre as doses de curcumina administradas e a diminuição da imobilidade, observada nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado. Nossos resultados no teste de nado forçado, em animais pré-tratados com curcumina, nas doses de 50 e 100mg/Kg, p.o., antes da aplicação i.p. de LPS, permitiu-nos inferir que esta droga, foi capaz de reduzir significativamente o tempo de imobilidade de maneira dose-dependente, corroborando com os dados demonstrados anteriormente, evidenciando dessa forma, o papel antidepressivo da curcumina.

Outro parâmetro investigado no comportamento doentio é a sociabilidade, a qual apresenta-se diminuída durante a endotoxemia. Um estudo realizado por Fishkin e Winslow (1997), demonstraram que camundongos submetidos ao desafio imunológico com LPS 15mg/Kg, i.p., apresentaram redução da interação social quando comparados ao grupo controle. Entretanto, quando estes animais receberam o pré-tratamento de indometacina 3 ou 30mg/Kg ou ibuprofeno 1 ou 100mg/Kg, ambas i.p., observou-se a prevenção da diminuição do comportamento de interação social, induzido pela endotoxina.

Porém, na literatura ainda são escassas pesquisas que abordem conjuntamente a administração de curcumina frente ao desafio imunológico com LPS no teste de interação social, tornando nosso estudo necessário, sendo o primeiro a realizar essa abordagem. Em nossos estudos, o pré-tratamento com curcumina nas doses de 50 e 100mg/Kg, p.o., antes da aplicação de LPS, preveniu a redução da interação social, induzida pelo mesmo.

A anorexia é uma resposta comportamental frequentemente observada durante o comportamento doente. Murray (1979), observou que camundongos alimentados à força durante infecções bacterianas, podem reduzir o tempo de sobrevivência e aumentar a mortalidade. Von Meyenburg e colaboradores (2004), relataram que camundongos com deleções genéticas em componentes da via de sinalização do TLR4, exibiram ausência de anorexia em resposta ao LPS. Entretanto, nos animais que foram expostos a esta endotoxina, mas que não sofreram esta deleção, apresentaram redução na ingestão alimentar.

Paiva *et al* (2010), demonstraram que o pré-tratamento com os anti-inflamatórios, indometacina 10mg/Kg e nimesulida 5mg/Kg, ambas administradas i.p., foram capazes de prevenir a diminuição da ingestão alimentar em 24 horas, nos animais submetidos a endotoxemia.

Quanto ao uso da curcumina em testes de avaliação do comportamento ingestivo, Sorrenti e estudiosos (2018), demonstraram que camundongos submetidos ao pré-tratamento (p.o.) com este fitoterápico, na dose de 50mg/Kg, apresentaram uma prevenção da redução da ingestão alimentar induzida pelo LPS. Resultado que corrobora com os achados de nosso estudo, onde constatamos que animais dos grupos curcumina(50mg/Kg)+LPS e curcumina(100mg/Kg)+LPS apresentaram um aumento da ingestão alimentar após 24 horas, quando comparados aos animais do grupo veículo+LPS, reforçando o possível papel da curcumina em modular regiões mesolímbicas e hipotalâmicas, relacionadas à motivação em procurar e consumir alimentos de elevado valor hedônico e regular os níveis e ação de mediadores orexígenos e anorexígenos, induzindo o apetite.

A respeito das citocinas plasmáticas, sabe-se que sua importância no processo inflamatório começou a ser ressaltada a partir da década de 80, desde então, diversos estudos abordaram seu desempenho em infecções virais, hepatite e no câncer. No comportamento doente, a literatura aborda seu papel crucial no estabelecimento de uma resposta imune eficaz e desfavorável ao patógeno. É sabido que a administração de injeções tanto intracerebroventricular quanto intraperitoneal, é capaz de induzirem roedores um estado doente completo, incluindo: redução do comportamento locomotor/exploratório, diminuição da ingestão alimentar, aumento do tempo de imobilidade, anedonia, abstinência social

e febre (BLHUTHE *et al.*, 1996; BLUTHE *et al.* 2000; KONSMAN *et al.*, 2000; PALIN *et al.*, 2007; PALLIN *et al.*, 2009; SKELLY *et al.*, 2013; WIECZOREK *et al.*, 2005).

Estudos relatam que o LPS é considerado um potente indutor da inflamação, capaz de desencadear uma resposta com liberação de mediadores pró- e anti-inflamatórios, os quais são essenciais neste processo conforme já abordado em nosso estudo (BLUTHE *et al.*, 1992; CHUN-HEY *et al.*, 2015; LAYE *et al.*, 2000; LUHESHI *et al.*, 1996).

Luheshi e colaboradores (1996), mostraram que ratos pré-tratados com *interleukin-1 receptor antagonist* (IL-1Ra) apresentaram uma redução da febre induzida pelo LPS. Estudos de Laye *et al* (2000) e Bluthe *et al* (1992), demonstram ainda, que injeções i.c.v. ou i.p. de IL-1Ra reverteram parcialmente a inibição da alimentação e comportamento social apresentada em animais que receberam LPS.

Bluthe *et al* (2000), evidenciaram que a administração de um fragmento de TNF (solúvel no cérebro) em camundongos IL-1R, bloqueia as ações biológicas do TNF- α endógeno no cérebro, podendo dessa forma extinguir a ativação imune induzida pelo LPS, revelando a capacidade das citocinas não atuarem isoladamente, mas agirem de forma sinérgica na mediação da cascata imune.

Em nosso estudo, observamos que o pré-tratamento com curcumina foi capaz de prevenir a síntese das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL1- β , induzidas pelo desafio imunológico com LPS, em todas as doses testadas. Nosso achado corrobora com o trabalho de Goel e colaboradores (2008), que descreveram a capacidade da curcumina de regular negativamente várias citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL1- β , bem como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), COX, lipoxigenase e o fator de transcrição, NF-kB.

Um trabalho de Boozari *et al* (2019), elucida o papel desta fitoterápico no processo inflamatório, evidenciando seu efeito anti-inflamatório como modulador, atuando sobre o receptor TLR4. Sabe-se que a ativação deste receptor desencadeia uma série de eventos intracelulares de sinalização, os quais culminam na expressão de NF-kB e produção de citocinas pró-inflamatórias, além de ser responsável pela ativação inata do sistema imunológico. O LPS induz a dimerização do TLR4 que, por sua vez, leva à ativação do ligante ao receptor.

Gradsier *et al* (2007) demonstraram que a curcumina se liga com afinidade à Proteína de Diferenciação Mielóide 2 (MD2), que é o componente de ligação ao

LPS do complexo MD-2/TRL4. Corroborando com este estudo, Zang e estudiosos (2018), demonstraram que um análogo de curcumina atuou como um inibidor do MD2, pela competição da ligação do LPS ao mesmo. Young e colaboradores (2006), demonstraram ainda, que durante a sinalização do TRL4, induzida por endotoxina, a curcumina é capaz de exercer efeitos inibitórios através de vias dependentes das proteínas MyD88 e TRIF.

Adicionalmente, a curcumina possui a capacidade de inibir diversos mediadores inflamatórios como: o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), a quinase associada ao receptor IL-1 (IRAK1), a proteína quimiotática de macrófagos-1 (MCP-1), a proteína inflamatória macrofágica-2 (MIP-2) e a expressão de NF- κ B, revelando-nos seu efeito na expressão das citocinas associadas à via de sinalização do TRL4 (KATO *et al.*, 2004; PENG *et al.*, 2010).

Alguns achados recentes da literatura demonstraram que as ações anti-inflamatórias da curcumina também podem estar relacionadas à via de sinalização JAK-STAT, participando dessa maneira da interação entre as citocinas e os seus respectivos receptores presentes no domínio citoplasmático. A curcumina possui a capacidade de bloquear a via JAK-STAT e conseqüentemente a síntese de citocinas pró-inflamatórias, amenizando a inflamação nas células cerebrais (BOYLE *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2003; XU *et al.*, 1997).

Conforme demonstrado nestes trabalhos, é claro o papel da curcumina na modulação da resposta inflamatória. Nosso estudo reafirma estes dados, pois os grupos (curcumina+LPS), apresentaram níveis plasmáticos de TNF- α e IL1- β significativamente baixos, em todas as doses testadas em relação ao grupo (V+Salina). Vale ressaltar ainda, que o comportamento doentio foi prevenido após duas horas da administração de LPS, em animais que receberam a curcumina nas doses (50 e 100mg/Kg). Contudo, o mesmo não pôde ser observado em animais curcumina(25mg/Kg)+LPS quando comparados ao controle.

Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e IFN- γ) promovem a ativação do processo inflamatório, auxiliando na eliminação de patógenos, por meio da ativação das células do sistema imune, como já mencionado. A respeito das anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β), elas atuam promovendo a redução da resposta inflamatória, através da diminuição da

síntese de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios (MARQUES; CIZZA; STERNBERG, 2007).

Chen *et al* (2018), mostraram que o pré-tratamento p.o. com curcumina nas doses de 50, 100 ou 200mg/Kg foi capaz de reduzir a concentração plasmática de TNF- α , bem como aumentar o nível plasmático de IL-10 em camundongos septicêmicos. Corroborando com este estudo, Kumar e colaboradores (2017), demonstraram ainda que o pré-tratamento com curcumina (120mg/Kg), via oral, foi capaz de reduzir a concentração plasmática das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-8, bem como aumentar o nível plasmático de IL-10.

A febre, mediada por citocinas, principalmente IL-6, apresenta um valor adaptativo ao animal, pois é capaz de favorecer a recuperação do hospedeiro, diminuindo a multiplicação de agentes termossensíveis e ativando as células do sistema imune envolvidas na destruição do patógeno, as quais auxiliam na produção de anticorpos (DANTZER, 2001; HART, 1988).

No que diz respeito a esta resposta adaptativa, relacionada ao ajuste da temperatura corporal, nossos resultados apontam que os animais que receberam V+LPS e curcumina(25mg/Kg)+LPS, apresentaram um quadro febril desencadeado 2 horas após a administração da endotoxina e persistiu nas horas seguintes avaliadas (6 horas). Foi possível notar ainda, a prevenção da febre induzida pelo LPS, em animais que receberam o pré-tratamento com curcumina nas doses de 50 e 100mg/Kg.

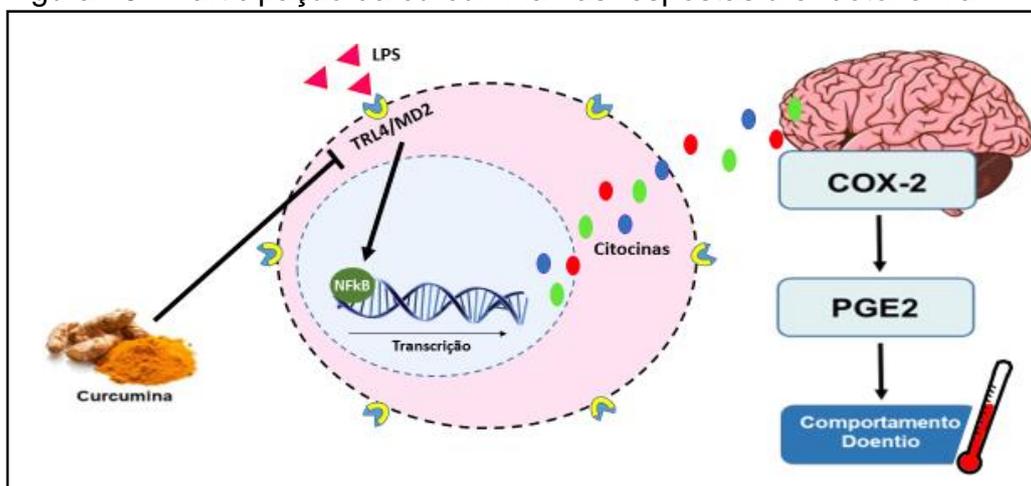
Oliveira (2016), induziu febre em camundongos utilizando a cepa de LPS utilizada em nosso estudo (026: B6) e observaram que uma dose menor, 200 μ g/Kg, foi capaz de desencadear este quadro. Paiva (2013), administraram LPS (500 μ g/Kg) em ratos e observaram uma resposta febril 2 horas após sua administração. Um trabalho de Huang e estudiosos (2008), demonstrou ainda, que coelhos que receberam injeção intravenosa de LPS (2 μ g/Kg), mas foram pré-tratados com curcumina (i.p.) apresentaram uma prevenção da resposta febril.

Na literatura são escassas as pesquisas que abordam conjuntamente a administração de curcumina frente ao desafio imunológico com LPS no desencadeamento da resposta febril em roedores, tornando o nosso estudo um pioneiro em abordar este parâmetro para as drogas em estudo.

Amparados no exposto, podemos sugerir que a resposta controversa observada em animais curcumina(25mg/Kg)+LPS, quanto aos parâmetros analisados no comportamento doentio, níveis plasmáticos das citocinas e febre, possivelmente estão relacionados a outras citocinas pró-inflamatórias, não dosadas em nosso estudo. Podemos enfatizar ainda, a participação das citocinas anti-inflamatórias, não menos importantes na modulação da resposta inflamatória, as quais também merecem nossa atenção.

Frente a estas informações, sugerimos que o pré-tratamento com curcumina nas doses de 50 e 100mg/Kg é capaz de prevenir o comportamento doentio, bem como o aumento dos níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias e aparecimento do estado febril, induzidos pelo LPS, possivelmente por inibir o co-receptor de TRL4, o MD2, os quais juntos ativam o fator de transcrição NF-kB, induzindo a síntese e liberação das citocinas, as quais se ligariam aos seus receptores no SNC e ativariam a COX-2, importante na síntese de prostaglandinas (figura 19) (BLUTHE et al., 2000; BOYLE et al., 2014; KIM et al., 2003; PIRES et al., 2013).

Figura 19 - Participação da curcumina nas respostas à endotoxemia



Fonte: Da autora.

Nota: No desafio imunológico com LPS, notamos o aumento da síntese de citocinas, as quais se ligam aos seus receptores no SNC, e ativam a atividade da COX-2, importante na síntese de PGs. Porém, quando pré-tratamos com curcumina (50 ou 100mg/Kg, p.o.), possivelmente inibimos o co-receptor de TRL4, MD2, o quais juntos ativam o fator de transcrição NF-kB, induzindo a síntese e liberação de citocinas, as quais se ligariam em seus receptores no SNC e ativariam a atividade da COX-2, induzindo a síntese de PGs, as quais são essenciais para o desenvolvimento do comportamento doentio.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho permite-nos concluir que o LPS na dose de 500µg/Kg induz o comportamento doentio, o qual é caracterizado pela diminuição da locomoção/exploração e da motivação para escapar das situações aversivas e anorexia, acompanhados pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL1- β . O pré-tratamento com curcumina (50 e 100mg/Kg) é capaz de prevenir o comportamento doentio e a febre possivelmente em decorrência da redução da síntese e liberação de citocinas induzidas pelo LPS.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B., *et al.* Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Res.**, (Houston, TX, USA). v. 23, n. 1A, p. 363-398, 2003.
- ANDREWS. P. W., *et al.* Blue again: pertubacional effects of antidepressants suggest monoaminergic homeostasis in major depression. **Frontiers in Psychology**. (Virginia, VA, EUA). v. 159, n. 2, p. 1-24, 2011.
- ALMEIDA. M.C., *et al.* Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. **Eur J Neurosci.**, (Phoenix, AZ, EUA), v. 23. p, 3359–3367, 2006.
- ARAÚJO, C. C., LEON, L. L. Biological actives of *Curcuma longa* L. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). v. 96, n. 5, p. 723-728, 2001.
- ARONOFF, D. M.; NEILSON, E. G. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. **American Journal of Medicine**. (Nashville, TN, EUA). v. 111, n. 4, p. 304-315, 2001.
- AUBERT, A.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Differential effect of lipopolysaccharide on food hoarding behavior and food consumption in rats. **Brain Behav. Immun.**, (Bordeaux, França). v. 11, n. 3, 229–238, 1997.
- AYOUB, A. E., *et al.* Increased Morphological Diversity of Microglia in the Activated Hypothalamic Supraoptic Nucleus. **The Journal of Neuroscience**. (Morgantown, West Virginia, EUA). v. 23, p. 7759-7766, 2009.
- BASSI. G. S., *et al.* Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behavior Evaluated in Different Models of Anxiety and Innate Fear in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. (Ribeirão Preto, SP, Brasil). v. 110, p. 359-369, 2012.
- BASNET, P., SKALKO-BASNET, N. Curcumin: na anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to câncer treatment. v. 16, n. 16, p. 4567-4598, 2011.
- BANASIKOWSKI, T.J. *et al.* Repeated exposure of male mice to low doses of lipopolysaccharide: Dose and time dependent development of behavioral sensitization and tolerance in an automated light–dark anxiety test. **Behav Brain Res**. v. 286, p. 241-248, 2015.
- BARANKEVIEZ. G. B; SALGADO. J. M. **Poder antioxidante da cúrcuma (*Curcuma longa*L) nos parâmetros neuroquímicos em ratos induzidos a depressão**. 55 f. 2015. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Departamento de Agricultura. Programa Ciência e Tecnologia de Alimentos. Piracicaba. 20 15.

BEM-SHAUL, V.; SOFER, Y.; BERGMAN, M. et al. Lipopolysaccharide induced oxidative stress in the liver: comparison between rat and rabbit. **Shock**. (Ramat Gan, Israel). v. 12, n. 4, p. 288-293, 1999.

BERBIGIER. I; MARQUES. J. G. S; de SOUZA. A. H. Efeito da curcumina da depressão induzida por estresse crônico e moderado e imprevisível em camundongos. In. REUNIÃO ANNUAL DA SBPC, 69º., 2017, Universidade Federal de Minas Gerais, **Anais...**, Farmacologia, 2017. p. 1-4.

BEUTLER, B.; RIETSCHER, E.T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat Rev Immunol.**, (La Jolla, California, EUA). v. 3, n.2, p. 169-176, 2003.

BIANCHINI, M. L. P; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Ver. Nutr, Campinas**. (Ribeirão Preto, SP, Brasil). v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BICEGO, K. C.; BARROS, R. C. H.; BRANCO, L. G. S. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology**. (Jaboticabal, SP, Brasil). v.147, p. 616-39, 2007.

BLOMQUIST. A; ENGBLOM. D. Neural Mechanisms of Inflammation-Induced Fever. **Neuroscientist.**, (Linköping, Suécia). v, 24. n, 4. p, 381-399, 2018.

BLUTHE. R. M; DANTZER. R. KELLEY. R. W. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. **Brain Res.**, (Bordeaux, França). v. 573. p. 318-320, 1992.

BLUTHE, R. M. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. The first demonstration that section of the vagus nerves blocks immune-to-brain communication and abrogates lipopolysaccharide-induced sickness behaviour without compromising the peripheral immune response. **C R Acad. Sci.**, (Bordeaux, França). v. 317, p. 499–503, 1994.

BLUTHE, R. M. *et al.* Vagotomy attenuates behavioural effects of interleukin-1 injected peripherally but not centrally. **NeuroReport.**, (Bordeaux, França). v. 7, n. 9, p. 1485-1488, 1996.

BLUTHE. R. M. *et al.* Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. **Eur. J. Neurosci.**, (Bordeaux, França). v. 12. p. 4447-4456, 2000.

BLUTHE. R. M. *et al.* The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. **Physiol. Behav.**, (Bordeaux, França). v. 70. p. 367-373, 2000.

BOOZARI. M; BUTLER. A. E; SAHEBKAR.A. Impact of curcumin on toll-like receptors. **J Cell Physiol.**, (Mashhad, Irã). v. 1. p. 1-13, 2019.

BOULANT, J. A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Ann N Y Acad Sci.**, (Columbus, EUA). v. 856, p. 108-115, 1998.

BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical Infectious Diseases**, (Columbus, EUA). v. 31, p. 157-161, 2000.

BOYLE. K. *et al.* The JAK inhibitor tofacitinib suppresses synovial JAK1-STAT signalling in rheumatoid arthritis. **Ann. Rheumatic Dis.**, (San Diego, Califórnia, EUA). v. 74. n. 6. p. 1311-1316, 2014.

CABRAL, L. D. M. **Influência do receptor vanilóide tipo 1 (TRPV1) na endotoxemia.** 149.f. 2016 Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alfenas. Departamento de Fisiologia. Programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas. Alfenas. 2016.

CABRAL, L.D.M.; GIUSTI-PAIVA, A. The Transient Receptor Potential Vanilloid 1(TRPV1) antagonist capsazepine improves the impaired lung mechanics during endotoxemia. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, (Alfenas, MG, Brasil). v, 119. n, 5. p, 421-427, 2016.

CAO. C. *et al.* Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. **Brain Res.**, (Japão). v. 733. p. 263-272, 1996

CARPENTIER, P.A., *et al.* Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. **Glia**. v. 49, p. 360–374, 2005.

CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMEDE, P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in rat light/dark and dark/light tests. **Behav Brain Res.**, (Bordeaux, França). v. 85, p. 27-35, 1997.

CHEN. L *et al.* Curcumin attenuates sepsis-induced acute organ dysfunction by preventing inflammation and enhancing the suppressive function of Tregs. **International Immunopharmacology**. (Wenzhou Key, China). v, 61. p, 1-7, 2018.

CHU-HEY. P. *et al.* Sickness: From the focus on cytokines, prostaglandins, and complement factors to the perspectives of neurons. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews.**, (Hong Kong, Japão). v. 57. p. 30-45, 2015.

CLEMENT, J.G.; MILLS, P.; BROCKWAY, B. Use of telemetry to record body temperature and activity in mice. **J Pharmacol Methods**. (Raitons, Alberta, Canadá). v.21, n. 2, p. 129-140, 1989.

CRUNFLI, F. VILELA, F. C., GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyron. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, (Alfenas, MG, Brasil). v, 42. n, 3. p, 246-255, 2014

COLEMAN, E. S., *et al.* Insulin treatment prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats at 4 as 8 weeks of diabetes duration. **Brain Research**. (Auburn, AL, EUA). v. 1306, p. 131-141, 2010.

COPPLE, I. M. The Keap1-Nrf2 cell defense pathway – a promising therapeutic target. **Advances in Pharmacology**. (Liverpool, Inglaterra). v. 63, p. 43-79, 2012.

DANTZER, R. *et al.* Cytokines and sickness behavior. In. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES. 2006, Nova York, EUA. **Anais...**, 1998 p. 586-590.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain Behav Immun.**, (Bordeaux, França). v. 15, n. 1, p. 7-24, 2001.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **Eur J Pharmacol.**, (Bordeaux, França). v. 500, p.399- 411, 2004.

DANTZER, R., *et al.* From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews – Neuroscience**. (Bordeaux, França). v. 9, p. 46–56, 2008.

DANTZER, R. Cytokine, sickness behavior, and depression. **Immunol Allergy Clin North Am.**, (Bordeaux, França). v. 29, p.247–64, 2009.

DAVALOS, D., *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. **Nature neuroscience**. (Nova York, EUA). v. 8, p. 752–758, 2005.

DELLAGIOIA, N.; HANNESTAD, J. A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. **Neurosci Biobehav Rev.**, (New Heaven, EUA). v. 34, n, 1, p.130–143, 2010

PAIVA, V. N. *et al.* Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Behavioural Brain Research.**, (Alfenas, MG, Brasil). v. 215, p. 146-151, 2010.

PAIVA, V. N. **Influência do sistema endocanabinóide sobre o Sickness Behavior induzido por endotoxemia em ratos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alfenas. 96.f. 2013. Departamento de Fisiologia. Programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas. Alfenas. 2013.

DER-AVAKIAN, A; MARKOU, A. Withdrawal from chronic exposure to amphetamine, but not nicotine, leads to an immediate and enduring deficit in motivated behavior without affecting social interaction in rats. **Behav Pharmacol.**, (La Jolia, EUA). v. 21, n. 4, p. 359-368, 2014.

DETKE, M., *et al.* Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Exp Clin Psychopharmacol.**, (Philadelphia, EUA). v. 15, p. 107-112, 1997.

DELLAGIOIA, N.; HANNESTAD, J. A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. **Neurosci Biobehav Rev.**, (New Hevean, EUA). v. 34 (1), p.130–143, 2010

DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; WOLFF, S. M. New concepts on the pathogenesis of fever. **Reviews of infectious diseases.** (Boston, Massachusetts, EUA). v. 10, n. 1, p. 168-189, 1988.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, (Shreveport, LA, EUA). v. 81, p. 688-693, 2005.

DUNN. A. J. The role of cyclooxygenases in endotoxin- and interleukin-1-induced hypophagia. **Brain Behav. Immun.**, (Shreveport, LA, EUA). v. 14. p. 141-152, 2000.

EK, M; ARIAS, C; SAWCHENKO, P; ERICSSON-DAHLSTRAND, A. Distribution of the EP3 prostaglandin E (2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. **J Comp Neurol.**, (Stockholm, Suécia). v. 428, n. 1, p. 5-20, 2000.

ELMQUIST, J. K. *et al.* Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. **The Journal of Comparative Neurology**, (Boston, Massachusetts, EUA). v. 381, p. 119-129, 1997.

ENGBLOM, D. *et al.* Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. **Journal of Molecular Medicine.**, (Linköping, Suécia). v. 80, n. 1, p. 5-15, 2002

ENGBLOM, D.; ANDERSSON, I.M.; SAHA, S. *et al.* Induction of microsomal prostaglandin E synthase in the brain endothelium and parenchyma in adjuvant-induced arthritis. **J Comp Neurol.**, (Linköping, Suécia). v. 452, p.205-2014, 2012.

- EVANS. S. S; REPASKY. E. A; FISHER. D. T. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. **Nat Rev Immunol.**, (Nova York, EUA). v. 15. n, 6. p, 335-349, 2015.
- FARINA, C; ALOISI, F; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends in Immunology.**, (Milão, Itália). v. 28, p. 138–145, 2007.
- FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. Can social interaction be used to measure anxiety?. **Br J Pharmac.**, (Londres, Inglaterra). v. 62, p. 19-24, 1978.
- FELEDER. C; PERLIK. C. M; BLATTEIS. C. M. Preoptic alpha 1- and alpha 2-noradrenergic agonists induce, respectively, PGE2-independent and PGE2-dependent hyperthermic responses in guinea pigs. **J. Physiol. Regul.**, (Mephis, EUA). v. 286. p. 1156-1166, 2004
- FLECK. M. P. A., *et al.* Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão (versão integral). **Ver. Bras. Psiquiatr.**, (Brasil). 25. n, 2. p, 114-122, 2003.
- FLORES-MARTINEZ. M. Y., *et al.* Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide. **Journal of Immunology Research.**, (Cidade do México, México). p. 1-19, 2018.
- FRENOIS, F.; MOREAU, M.; O'CONNOR, J. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology.** (West Gregory Drive, Urbana, EUA). v. 32, n. 5, p. 516-531, 2007.
- GALIC. A. M; RIAZI. K; PITTMAN. Q. J. Cytokines and brain excitability. **Front Neuroendocrinol.**, (Calgary, Alberta, Canadá). v, 33. n, 1. p, 116-125, 2013.
- GLAUSER, M.P. Pathophysiologic basis of sepsis: considerations for future strategies of intervention. **Crit Care Med.**, (Lausanne, Suíça). v. 8, n. 9, p. 54-58, 2000.
- GOEL, A., *et al.* Curcumin as Curcumin: from kitchen to clinic. **Biochem Pharmacol.** v. 75, n. 4, p. 787-809, 2008.
- GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior.** (EUA). v. 47, n. 5, p. 963-991, 1990.
- GRANGER, J.I. *et al.* Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. **Psychoneuroendocrinology.**, (Ann Arbor, MI, EUA). v. 38, n. 7, p. 1047-1057, 2013.

GRIFFIN, J. D. Central thermosensitivity and the integrative responses of hypothalamic neurons. **Journal of Thermal Biology**. (EUA). v. 29, p. 327-331, 2004.

HASDAY, J. D; THOMPSON, C; SINGH, I. S. Fever, immunity and molecular adaptations. **Compr Physiol**. v, 4. p, 109-148, 2014.

HAVA, G.; VERED, L.; YAEL, M.; MORDECHAI, H.; MAHOUD, H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. **Developmental Psychobiology**. (Beer-Sheva, Israel). v. 48, n. 2, p. 162-168, 2006.

HEIN, A. M. *et al.* Prostaglandins are necessary and sufficient to induce contextual fear learning impairments after interleukin-1 beta injections into the dorsal hippocampus. **Neuroscience**. (Boulder, EUA). v, 150. p. 754-763, 2007.

HENRY, C. J.; HUANG, Y.; WYNNE, A. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **Journal of Neuroinflammation**. (Columbs, EUA). v. 5, 2008.

HILÁRIO, M. O. E; TERRERI, M. T; LEN, C. A. Antiinflamatórios não hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **J. Pediatria**. (Brasil). v, 82. n, 5. p, 206-212, 2006.

HUANG, W. T., *et al.* Curcumin inhibits the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE2 in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. **European Journal of Pharmacology**. (Madou, Taiwan). v, 593. p, 105-111, 2008.

ITOH, K., *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes & Development**, v. 13, n. 1, p. 76-86, 1999.

JAYAPRAKASHA, G.K., *et al.* Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **J Agric Food Chem**. v. 50, n. 13, p. 3668-3672, 2002.

JIANG, H. *et al.* Antidepressive-like effects of curcumin in chronic mild stress of rats: involvement of its anti-inflammatory action. **Neuro-Psychopharmacology**. (Jinan, China). v. 47. p. 33-39, 2013.

KAWAHARA, K., *et al.* Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**., (Japão). v, 1851. n, 4. p, 414-421, 2014.

KATO, S. *et al.* Endotoxin-induced chemokine expression. In murine peritoneal mesothelial cells: The role of toll-like receptor 4. **Journal of the American Society of Nephrology**. (Nagoia, Japao). v. 15. n. 5. p. 1289-1299, 2014.

KHAN, K. N. *et al.* Pharmacology of cyclooxygenases-2 inhibition in the kidney. **Kidney International**, v. 61, p. 1210-1219, 2002.

KIM. H. Y. *et al.* Curcumin suppresses Janus kinase-STAT inflammatory signaling through activation of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 in brain micróglia. **J. Immunol.**, (Suwon, Coréia). v. 171. n. 11. p. 6072-6079, 2003.

KONSMAN. J. P. *et al.* The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. **Eur. J. Neurosci.**, (Bordeaux, França). v. 12. p. 4434-4446, 2000.

KRISHNADAS, R.; CAVANAGH, J. Depression: an inflammatory illness? Journal of Neurology. **Neurosurgery and Psychiatry**. (Subotic Street, Belgrade, Sérvia). v. 83, n. 5, p. 495-502, 2012.

KULKARNI, S.K.; BUTHANI, M.K.; BISHNOL, M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. **Psychopharmacology Berl**, (Chandigarh, India). v. 201, n. 3, p. 435-442, 2008.

KUMAR. P., *et al.* TNF- α , IL-6 and IL-10 expressions, responsible for disparity in action of curcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Mol Cell Biochem.**, (Guwahati, Assam, Índia). v, 431. n. 1. p, 113-122, 2017.

LAYE. S. *et al.* Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, (Bordeaux, France). v. 279. p. 93-98, 2000.

LEÃO. A. M., *et al.* Prevalence and factors associated with depression and anxiety among university students in the field of health in a large urban center in northeast of Brazil. **Ver. Brasileira de Educação Médica**. (Brasil). v, 42. n, 4, p. 55-65, 2018.

LEDEBOER, A. *et al.* Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. **European Journal of Neuroscience**. (Amsterdam, Holanda). v. 16, n. 7, p. 1175-1185, 2002.

LEON. L. R. Cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. **J Appl Physiol.**, (Natick, Massachusetts, EUA). v, 92. p, 2648-2655, 2002.

LIM. C. L; BYRNE. C; LEE. J. K. W. Human thermoregulation and measurement of body temperature in exercise and clinical settings. **Ann Acad Med Singapore.**(Singapura). v, 37. p, 34-53, 2008.

LEORNARD, B.E. Inflammation, depression and dementia: Are they connected?. **Neurochem. Res.**, (Maastricht, Países Baixos). v, 32. p, 1749–1756, 2007.

LI, R. *et al.* The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuros Letters.** (Nanjing, China). v. 594, p. 17-22, 2015.

LIU, G.X. *et al.* Reduced Anxiety and Depression-Like Behaviors in Mice Lacking GABA Transporter Subtype 1. **Neuropsychopharm.**, (Shanghai, China). v. 32, p. 1531-1539, 2007.

LIU. W; TANG, Y; FENG, J. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. **Life Sciences.**, (China). v. 89, p. 141–146, 2011.

LINTHORST, A. C. *et al.* Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 beta on hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, and free corticosterone levels: an in vivo microdialysis study. **The Journal of Neuroscience.**, (Munich, Alemanha). v. 15, n. 4, p. 2920 – 2934, 1995.

LUHESHI.G. *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. **Am. J. Physiol.**, (Manchester, Inglaterra). v. 270. p. 91-95, 1995.

MACHOWIAK. P. A. Temperature regulation and pathogenesis of fever. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practise of infectious disease. **Elsevier Churchill Livingstone.** v, 1. n, 6. p. 703-718, 2005.

MAES, M., *et al.* The new “5-HT” hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. **Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry.** (Bangkok, Tailandia). v, 35. n, 3. p, 702–21, 2011.

MAES, M., *et al.* Increased autoimmune activity against 5-HT: a key component of depression that is associated with inflammation and activation of cell-mediated immunity, and with severity and staging of depression. **Journal of Affective Disorders.** (Bangkok, Tailandia). v, 136. n, 3. p, 386–92, 2012.

MAGESH, S., *et al.* Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic agents. **Medicinal Research Reviews.** (Piscataway, NJ, EUA). v. 32, n. 4, p. 687-726, 2012

- MANJI, H. K., *et al.* The cellular neurobiology of depression. **Nat. Med.**, (Bethesda, Maryland, USA). v. 7, p. 541-547, 2001.
- MANSOUR. A. H; HASSAN. A. W; GEORGY. S. G. Neuroinflammatory reactions in sickness behavior induced by bacterial infection: Protective effect of minocycline. **J Biochem Mol Toxicol.**, (Giza, Egito). v, 32. n, 2, 2017.
- MANSOURi, Z. *et al.* Curcumin has neuroprotection effect on LPS rat model of Parkinson. **J. Mol. Neurosci.**, (Theran, Irã). v, 47. n. 2, p. 234-242, 2012.
- MARQUES. A. H; CIZZA. G; STERNBERG. E. Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders. **Rev Bras Psiquiatr.** (Bethesda-Rockville, Maryland, EUA). v, 29. p, 29-32, 2007.
- MELLO. B. S. F. *et al.* Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research.**, (Fortaleza, CE, Brasil). v. 47. p. 1521-1529, 2013
- MILLER, N. E. Some psychophysiological studies of motivation and of the behavioral effects of illness. **Bull. Br. Psychol. Soc.** v.17, p.1–20, 1964.
- MOLTZ, H. Fever: causes and consequences. **Neuroscience and BioBehavioral Reviews.**, (Chicago, EUA). v. 17, p.237-269, 1993.
- MORRISON. S. F; MADDEN. C. J; TUPONE. D. Central control of brown adipose tissue thermogenesis. **Front Endocrinol (Lausanne).** (Portland, OR, USA.).v. 3, 2012.
- MURRAY. M. I; MURRAY. M. J. Anorexia of infection as a mechanism of host defense. **Am J Clin Nutr.**, (Dublin, Irlanda). v. 32. p. 593-596, 1979.
- MURRAY. C. L. *et al.* Exacerbation of CNS inflammation and neurodegeneration by systemic LPS treatment is independent of circulating IL-1beta and IL-6. **J. Neuroinflamm.**, (Dublin, Irlanda). v. 8. p. 50, 2011.
- MYER, D. J., *et al.* Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. **Brain.**, (Los Angeles, CA, EUA). v. 129, p. 2761–2772, 2006.
- NAKAMURA. K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, (Sakyo-ku, Kyoto, Japão). v, 5. p, 207-228, 2011.
- NAKAMURA. K; MORRISON. S. Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** (Sakyo-ku, Kyoto, Japão). v, 292. n, 1. p, 127-136, 2007.

NILSSAN, A., *et al.* Inflammation-induced anorexia and fever are elicited by distinct prostaglandin dependent mechanisms, whereas conditioned taste aversion is prostaglandin independent. **Brain Behav Immun.**, (Linkoping, Suécia). v, 61. p, 236-246, 2017.

NÖLDNER, M.; SCHÖTZ, K. Inhibition of lipopolysaccharid-induced sickness behavior by a dry extract from the roots of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) in mice. **Phytomedicine.** (Karlsruhe, Alemanha). v. 14, p. 27-31, 2007.

NORDEN, D. M., *et al.* TGF-beta produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. **Glia.** (Columbus, Ohio, EUA). v. 62, p. 881-895, 2014

NORDEN, D. M., *et al.* Sequential activation of Microglia and Astrocyte cytokine expression precedes Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. **Glia.** (Columbus, Ohio, EUA). v. 64. p, 300-316.

O'CONNOR, J.C.; LAWSON, M.A.; ANDRÉ, C. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Molecular Psychiatry.** (Urbana, IL, USA). v. 14, n. 5, p. 511–522, 2009.

OLIVEIRA-LIMA, O. C., *et al.* Lipid dynamics in LPS-induced neuroinflammation by DESI-MS imaging. **Brain, Behavior, and Immunity.** (Belo Horizonte, MG, Brasil). v, 18. p, 889-1591, 2019.

OLIVEIRA, M. K. **Sickness Behavior em camundongos pré-tratados com inibidor da HMG-CoA Redutase.** 92. f. 2016. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alfenas. Departamento de Fisiologia. Programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas. Alfenas. 2016.

PALIN, K. *et al.* TNFalpha-induced sickness behavior in mice with functional 55 kD TNF receptors is blocked by central IGF-I. **J. Neuroimmunol.**, (Urbana, IL, USA). v. 187. p. 55-60, 2007.

PALIN, K. *et al.* The type 1 TNF receptor and its associated adapter protein, FAN, are required for TNFalpha-induced sickness behavior. **Psychopharmacology.**, (Urbana, IL, USA). v. 201. p. 549-556, 2009.

PAULA-JUNIOR, D. **Influência dos receptores GHS-R1a nas respostas comportamentais e térmicas diante à endotoxemia.** 2015. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alfenas. Departamento de Fisiologia. Programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas. Alfenas. 2015.

PENG, L. *et al.* Effects of curcumina on mRNA expression of cytokines related to toll-like receptor 4 signaling in THP-1 cells. **Chinese Journal of Dermatology**, v. 43. n. 7. p. 493-496, 2010.

PIRES. L. F., *et al.* Efeito antidepressivo e atividade serotoninérgica da curcumina em modelos de animais de depressão. **Rev Farmacologia de Chile**, v. 6, n. 1, p. 37, 2013.

RIBEIRO D. E. *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase accentuates endotoxin - induced sickness behavior in mice. **PharmacolBiochem Behav.**, (Alfenas, MG, Brasil). v. 103, n. 3, p. 535-40, 2013.

RIVEST, S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Psychoneuroendocrinology**. (Québec, Canadá). v. 26, n.8, p. 761-788, 2001.

ROMANOVSKY, A. A. *et al.* Endotoxin shock-associated hypothermia. How and why does it occur?. **The New York Academy of Sciences**. (Japão). v. 813, p. 733-737, 1997.

ROMANOVSKY, A. A. *et al.* Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic?. **American Journal of Physiology**. (Portland, Oregon, EUA). v. 275, p. 332-338, 1998.

ROMANOVSKY. A. A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. **Sou J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, (Phoenix, AZ, EUA). v, 292. p, 37-46, 2007.

RORATO R., *et al.* Cannabinoid CB1 receptor restrains accentuated activity of hypothalamic corticotropin-releasing factor and brainstem tyrosine hydroxylase neurons in endotoxemia-induced hypophagia in rats. **Neuropharmacology.**, (Ribeirão Preto, SP, Brasil). v. 63, p. 154-160, 2012.

ROTH. J; BLATTEIS. C. M. Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. **Compr Physiol.**, (Memphis, Tennessee, EUA).v, 4. p, 1563-1604, 2014.

SAPER, B.; BREDER, C. The neurologic basis of fever. **The Journal of Medicine**. (Boston, Massachusetts, USA). v. 330, n. 26, p. 1880-1886, 1994.

SAPER. C. B; ROMANOVSKY. A. A; SCAMMELL. T. E. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. **Nat Neurosci.**, (Boston, Massachusetts, USA). v, 15. p, 1088-1095, 2012.

SCHEDLOWISKY. M; ENGLER. H; GRIGOLEIT. J. H. Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: A model to disentangle immune-to-brain communication. **Brain, Behavior, and Immunity**. (Essen, Alemanha). v, 35. p, 1-8, 2014.

SCHILTZ, J. C. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. **J. Neurosci.**, (La Jolia, Califórnia, EUA). v. 22. p. 5606-5618, 2002.

SEEHOFER, D., *et al.* Curcumin attenuates oxidative stress and inflammatory response in the early phase after partial hepatectomy with simultaneous intra-abdominal infection in rats. **J Surg Res.**, (Berlin, Alemanha). v. 159, n. 1, p. 497-502, 2010.

SIDDIQUI, A.M., *et al.* The anti-inflammatory effect of curcumin in na experimental modelo of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptpr-gamma. **Crit Care Med.**, (Nova York, EUA). v.34, n.7, p. 1884-1882, 2006.

SILVA, V. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Sickness behavior is delayed in hypothyroid mice. **Brain, Behavior, and Immunity.** (Alfenas, MG, Brasil). v. 45, p. 109-117, 2015.

SHI, J. *et al.* Prostaglandin E2 E-prostanoid 4 receptor exerts anti-inflammatory effects in brain innate immunity. **J. Immunol.**, (Stanford, CA, EUA). v 184. p. 7207-7218, 2010.

SHIH, R. H. *et al.* Induction of heme oxygenase-1 attenuates lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse brain endothelial cells. **J. Neuroinflamm.**, (Kwei-San, Tao-Yuan, Taiwan). v. 7. p. 86, 2010.

SKELLY, D. T. *et al.* A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of systemic LPS, IL-1Beta, TNF-alpha and IL-6 challenges in C57BL/6 mice. **PLOS ONE.**, (Dubln, Irlanda). v. 8. p. 123, 2013

SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes in neural repair and protection. **The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology and Psychiatry:** (Los Angeles, CA, EUA). v. 11, p. 400–407, 2005.

SOFRONIEW, M. V; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and phatology. **Acta Neurophatologica.** (Los Angeles, CA, EUA). v. 199, p. 7-35, 2010.

SOMAPAMIT, K., *et al.* Curcumin improves vascular function and alleviates oxidative stress in non-lethal lipopolysaccharide-induced endotoxaemia in mice. **Eur J Pharmacol.**, (Khon Khen, Tailandia). v. 616, n. 6, p. 192-199, 2009.

SORRENTI, V. *et al.* Curcumin Prevents Acute Neuroinflammation and Long-Term Memory Impairment Induced by Systemic Lipopolysaccharide in Mice. **Frontiers in Pharmacology.** (Pádua, Itália). v. 9. p. 183, 2018.

STONE, E.A. *et al.* Depressive behavior in mice due to immune stimulation is accompanied by reduced neural activity in brain regions involved in positively motivated behavior. **Biol Psychiatry.**, (Nova York, EUA). v.60, p.803–811, 2006.

SU. W; DING. X. Methods of Endotoxin Detection. **Journal of Laboratory Automation.** v, 20. n, 4. p, 354-364, 2015.

TAKEMURA. S. M., *et al.* Responses of perivascular macrophages to circulating lipopolysaccharides in the subfornical organ with special reference to endotoxin tolerance. **Journal of Neuroinflammation.** (Kashihara, Nara, Japão). v, 1. n, 39. p, 1431-1436, 2019.

TEIXEIRA, C.C.C. Desenvolvimento tecnológico fitoterápico a partir de rizomas de *Curcuma longa* e avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. 2009. **Tese de Doutorado.** Universidade de São Paulo, 2010.

TEELING. J. L. *et al.* The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1. **Brain Behav. Immun.**, (Inglaterra). v. 24. p. 409-419, 2010.

THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCE (IUPS THERMAL COMMISSION). Glossary of Terms for Thermal Physiology. **Japanese Journal of Physiology**, v. 5, p. 245-280, 2001.

TOMAZ. V. S. *et al.* Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience.** (Fortaleza, CE, Brasil). v. 5. p. 11, 2013.

TOYAMA, R. P. Avaliação comportamental e bioquímica de camundongos submetidos a um modelo experimental de inflamação associada a criolesão. 68. f. 2016. **Dissertação de Mestrado.** UFSC. 2012.

TOWNSEND, B. E. *et al.* Dietary broccoli mildly improves neuroinflammation in aged mice but does not reduce lipopolysaccharide-induced sickness behavior. **Nutrition Research.**, (Urbana, IL, EUA). v. 34, p. 990-999, 2014.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Behav Brain Res.**, (Afenas, MG, Brasil). v. 263, p. 190-197, 2014.

von MEYENBURG. C. *et al.* Role for CD14, TLR2, and TLR4 in bacterial product-induced anorexia. **Am J Physiol.**, (Schwerzenbach, Suíça). v. 287. p. 298-305, 2004.

WANG, D. *et al.* Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. (Baton Rouge, LA, EUA). v. 90, n. 6, p. 455-460, 1998.

WANG, Q., *et al.* Neuroprotective mechanisms of Curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. **J. Neurosci. Res.**, (Columbia, Missouri, EUA). v. 82, p.138–148, 2005.

WANG, R. *et al.* The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. **Eur J Pharmacol.**, (Beijing, China). v. 578. n. 1. p. 43-50, 2007.

WANG, Z., *et al.* The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Behavioural Brain Research**. (Jinan, Shandong, China). v. 274. p. 282-290, 2014.

WATKINS, L. R. *et al.* Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Research**. (Colorado, EUA). v. 654, n. 1, p. 15-26, 1994.

WIECZOREK, M. *et al.* Physiological and behavioral responses to interleukin-1 β and LPS in vagotomized mice. **Physiol. Behav.**, (Warsaw, Poland). v. 85. p. 500-511, 2005.

WILCONSON, J. S. *et al.* Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor α . **Behavioural Brain Research**, (Chicago, IL, EUA). v. 177, p. 109-116, 2007.

XIA, X. *et al.* Behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects of the ethanolic extract from *Curcuma longa L.* in the mouse forced swimming test. **J Ethnopharmacol.**, (Nanjing, China). v. 21. n. 110. p. 356-63, 2007.

XIAO, X., *et al.* Curcumin protects against sepsis-induced acute lung injury in rats. **J Surg Res.**, (Changsha, Hunan, China). v. 176, n.1, p. 31-39, 2012.

XU, Y. *et al.* Curcumin inhibits IL1 α and TNF- α induction of AP-1 and NF- κ B DNA-binding activity in bone marrow stromal cells. **Hematopathol. Mol. Hematol.**, (Detroit, IL, EUA). v. 11. n. 1. P. 49-62, 1997.

XU, Y. *et al.* Antidepressant effects of curcumin in the forced swim test and olfactory bulbectomy models of depression in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, (Pequin, China). v. 82. n. 1. p. 200-206, 2005.

XU, Y. *et al.* Antidepressant effects of curcumin in the forced swim test and olfactory bulbectomy models of depression in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. (Pequin, China). v. 82. p. 200-206, 2005 a.

- XU. Y. *et al.* The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice. **Eur J Pharmacol.**, (Beijing, China). v. 518. n. 1. p. 40-46, 2005 b.
- YEH. C. H. *et al.* Dexmedetomidine reduces lipopolysaccharide induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **Plos One.** (Changhua, Taiwan.). v, 13. N, 1. p,1-18, 2018.
- YI. L. T., *et al.* Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of nobiletin. **Physiol Behav.**, (Fujian, China). v, 146. p, 1-6, 2011.
- YIRMIYA, R. *et al.* Behavioral effects of lipopolysaccharide in rats: involvement of endogenous opioids. **Brain Research.**, (Mount Scopus, Israel). v. 648, n. 1, p. 80-86, 1994.
- YU. Z. F; KONG. L. D; CHEN. Y. Antidepressant activity of aqueous extracts of *Curcuma longa* in mice. **J Ethnopharmacol.**, (Nanjing, China). v. 1. n. 83. p. 161-165, 2002.
- YOUNG. H. F. *et al.* Inhibition of homodimerization of toll-like receptor 4 by curcumin. **Biochemical Pharmacology.**, (California, EUA). v. 72. n. 1. p. 68-69, 2006.
- ZHU. P. *et al.* Heterogeneous expression and regulation of hippocampal prostaglandin E2 receptors. **J. Neurosci. Res.**, (New Orleans, Louisiana, EUA). v. p. 817-826, 2005.

ANEXO A - Carta de aprovação CEUA 39/2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito da curcumina sobre o *sickness behavior* em ratos", registrada com o nº 39/2018, sob a responsabilidade de Alexandre Giusti Paiva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 18/02/2019 a 30/01/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	436
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 18 de Fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG