

2.08.01 - Bioquímica / Química de Macromoléculas

EFEITO CITOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DA CURCUMINA PARA O TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO DE CÂNCER DE COLO UTERINO E CÂNCER COLORRETAL

Fabiana C. Giarola<sup>1\*</sup>, Leandro A. O. Barbosa<sup>3</sup>, Marco Andrey C. Frade<sup>2</sup>, Marcel N. Leite<sup>2</sup>

1. Estudante de IC da Universidade Federal de São João del-Rei- UFSJ

2. Pesquisadores da Divisão de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Laboratório de Cicatrização e Hanseníase), São Paulo, Brasil.

3. UFSJ - Laboratório Bioquímica Celular / Orientador

**Resumo:**

O açafrão é uma especiaria utilizada há milhares de anos na culinária, principalmente asiática, é conhecido cientificamente como *Curcuma longa* e vem se destacando por conta de seu composto ativo, a curcumina, que apresenta diversos efeitos benéficos ao organismo, tais como anti-inflamatório, antiviral, antibacteriano, antifúngico e anti-cancerígeno. Esta última tem grande destaque no cenário mundial, já que o câncer de colo uterino, por exemplo, corresponde a cerca de 15% de todos os tipos de cânceres femininos, sendo o segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres de todo mundo e é necessário o estudo de como esses compostos naturais são capazes de atuar sobre as células tumorais. Há estudos que demonstram a ação da curcumina em várias enzimas, entre elas a Na,K-ATPase, que alvo molecular promissor para efeitos antitumorais. Este estudo teve por objetivo avaliar a curcumina como um possível quimioterápico a partir do estudo das características únicas e distintas entre as células tumorais e as células normais do organismo.

**Autorização legal:** Processo HCRP 2722/2014 CEP

**Palavras-chave:** Curcumina, Na,K - ATPase, proliferação celular.

**Apoio financeiro:** CNPq, UFSJ, FAEPA HCFMRP, FAPESP

**UFSJ**

**Introdução:**

A curcumina (diferuloilmetano), um pigmento amarelo extraído do rizoma da planta *Curcuma longa* (Cúrcuma ou Açafrão-da-Índia), é uma substância bioativa natural amplamente estudada, pois apresenta diversos efeitos benéficos ao organismo, tais como anti-inflamatório, antiviral, antibacteriano, antifúngico, antioxidante e anti-cancerígeno. Esta última tem grande destaque no cenário mundial, já que o câncer de colo uterino, por exemplo, corresponde a cerca de 15% de todos os tipos de cânceres femininos, sendo o segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres de todo mundo e é necessário o estudo de como esses compostos naturais são capazes de atuar sobre as células tumorais. Suas ações antioxidante e anti-inflamatória conhecidas também podem ser estratégias importantes para melhorar a cicatrização de úlceras.

O objetivo avaliar a curcumina como um possível quimioterápico a partir do estudo das características únicas e distintas entre as células tumorais e as células normais do organismo.

**Metodologia:**

**1) Cultura de Células e tratamento com curcumina :** As células 3T3 (fibroblastos) e KC (queratinócitos) foram mantidas com meio RPMI e as células HeLa (carcinoma de cervix humano) e RKO (carcinoma de colo intestinal) foram mantidas com meio DEMEM, ambos complementado com 10% de soro fetal bovino, 60 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de penicilina em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**2)Ensaio de viabilidade celular–MTT:** As células foram cultivadas em placa de 96 poços (1x10<sup>5</sup>cels/mL) e após 24h foram testadas com concentrações crescentes com curcumina por 24 e 48h. Após o tratamento foi adicionado MTT (5mg/mL) e incubado por 3h a 37° C. Logo após o formazan será precipitado e solubilizado em 50µL de DMSO e feito a leitura a 550 nm.

**3)Ensaio de proliferação celular–Exclusão do azul de Tripán:** Foram cultivadas  $2 \times 10^5$  células por poço, em placas de seis poços por 24 horas. Depois, as células foram incubadas com meio sem soro por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com concentrações crescentes de curcumina. Após os tempos de tratamento, foram adicionados 500  $\mu$ L de tripsina 0,025% sobre as células e estas foram incubadas por 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram centrifugadas a 2400rpm por 5 minutos com 2mL de meio de cultura. O pellet foi ressuspenso com 500  $\mu$ L de meio de cultura e uma alíquota foi retirada para diluição 1:1 em azul de Tripán para quantificação das células em câmara de Neubauer.

**4)Ensaio de migração celular–Scratch Assay:** Foram plaqueadas  $4 \times 10^4$  células em uma placa de 24 poços até 80-90% de confluência. Um risco foi feito no fundo de cada poço com o auxílio de uma ponteira. Foi adicionado concentrações crescentes de curcumina. Após 24 horas, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 20 minutos, lavadas novamente com PBS e, por fim, foi adicionado o marcador nuclear DAPI. A placa foi armazenada em local escuro por 30 minutos e os resultados foram avaliados através de um microscópio de fluorescência (FRONZA et al., 2009).

**5)Determinação da atividade ATPásica da Na,K-ATPase:** A atividade ATPásica é determinada por método descontínuo no qual se baseia na dosagem de fosfato inorgânico (Pi), subtraindo-se a atividade ATPásica total da célula pela atividade após a inibição da Na,K-ATPase pela ouabaína, seu inibidor específico (FISKE; SUBBAROW, 1925).

**6)Cultura explante de pele humana (hOSEC):** Fragmentos de pele humana, saudáveis, descartados de cirurgias plásticas realizadas no HCRP-FMRP-USP, com o consentimento dos pacientes, foram utilizados para a cultura. Após a remoção do excesso de tecido gorduroso subcutâneo, a pele foi seccionada em fragmentos de 1,0 cm<sup>2</sup>. Em seguida, foi criada uma úlcera circular com diâmetro de 4,0mm utilizando-se *punch* cirúrgico em cada fragmento. Os fragmentos foram então posicionados com o lado dérmico sobre papel de filtro apoiado em grades metálicas em placas de cultura de 6 poços e a epiderme permaneceu acima da interface meio/ar. Foi adicionado o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 1%

de solução de antibiótico (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 mg/mL) juntamente com diferentes concentrações de curcumina.

**7)Histologia:** Seções parafinadas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise. Mudanças na morfologia epidérmica foram seguidas por análise qualitativa usando microscópio óptico (FRADE, et al., 2015).

### Resultados e Discussão:

O ensaio de viabilidade (MTT) em células tumorais foi possível observar que a droga tem efeito na viabilidade celular, diminuindo seu crescimento em aproximadamente em 30% nas concentrações de 5  $\mu$ M e 25  $\mu$ M em HeLa, já nas células RKO apenas em 50  $\mu$ M. O ensaio de proliferação em HeLa demonstrou que a curcumina não possui muita atividade, apenas na concentração de 50  $\mu$ M.

Para avaliar a atividade da enzima Na, K - ATPase foram realizados dois experimentos em que foi observado uma diminuição da atividade da enzima apenas nas hemácias, mas nas células tumorais não houve variações na atividade da enzima, sendo que possivelmente os eventos de morte celular que acontecem nessas concentrações de curcumina, então o efeito antitumoral da droga é observado independente da modulação da enzima

Os experimentos demonstraram que a curcumina não é tóxica nas células normais a partir da dose de 27,15  $\mu$ M, porém, apesar de não tóxica, a droga não se mostrou muito eficiente quanto a proliferação das células 3T3 e KC. No ensaio de migração, os resultados obtidos foram significativos em ambas as linhagens, sendo que a KC foi mais sensível a curcumina ao demonstrar que o efeito da migração se inicia na menor concentração utilizada de 2,715nM do que na linhagem 3T3, onde o efeito da droga é observado a partir de 27,15nM.

Este efeito da curcumina sobre a migração nestes tipos celulares é de suma importância, pois se tratam de células epiteliais que quando há alguma lesão, uma das suas funções é formar um novo tecido e quando a migração destas células, principalmente a 3T3, é acelerada mais rapidamente a pele irá se reconstituir.

Ao realizar o hOSEC e posteriormente a análise histológica, um experimento *ex vivo*, realizado a partir do bom resultado obtido no

Scratch em, pois demonstrou que a curcumina tem um efeito quando a célula se encontra em um estado de estresse. No caso do hOSEC, quando é causada a lesão no tecido, a droga se mostrou bastante efetiva no processo de cicatrização de 14 dias. O ensaio *ex vivo* demonstra que a curcumina atuando junto ao tecido pode estimular a proliferação de células e com isso acelerar o processo de cicatrização independente da resposta inflamatória sistêmica.

### **Conclusões:**

A partir do estudo, conclui-se que a curcumina tem um potencial antitumoral, levando a morte celular e inibindo sua proliferação em células HeLa, porém não foi possível afirmar que tais efeitos sejam causados pela modulação da Na, K - ATPase, podendo ser causada pela ativação de outras vias de sinalização.

Quando utilizada a droga com linhagens de células normais, foi possível observar que a curcumina também tem efeitos satisfatórios, pois não se mostrou tóxica e é capaz de acelerar um processo de cicatrização cutânea.

Contudo, pode-se dizer que a curcumina tem potencial para ser utilizada em tratamentos diferentes, sendo eles um possível antitumoral de origem natural e um cicatrizante epidérmico.

### **Referências bibliográficas**

AGGARWAL BB. et al. Curcumin: the Indian solid gold. **AdvExp Med Biol**, 2007, 595, p. 1-75.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375-400, 1925.

Frade MAC, Andrade TAM, Aguiar AFCL, Guedes FA, Leite MN, Passos WR, Coelho EB, Das PK. Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). **An Bras Dermatol**. 2015;90(3):347-50.

FRONZA, M. et al. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 463-467, 2009.