

# ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS INDUZIDAS POR CURCUMINA EM CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

1 **CARNEIRO**, Marcella L. Brettas, 2. **OTAKE**, Andréia, 3 **CHAMMAS**, Roger <sup>4</sup> **BÁO**, Sônia, <sup>5</sup> **GUILLO**, Lidia Andreu. 1-Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás (UFG); 74001-970.

**Palavras-chave:** curcumina, melanoma, apoptose.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da história da medicina, as plantas têm demonstrado ser valiosas fontes para drogas antitumorais (MANS, et al, 2000). O melanoma maligno é a forma mais agressiva e severa de câncer de pele e é a principal causa de morte em pacientes com câncer de pele (ODOT, et al, 2004). A Curcumina (diferuloilmetano) é um fitoquímico isolado do rizoma do açafrão (*Curcuma longa Linn*) e possui várias propriedades farmacológicas, incluindo antiproliferativa e anticancerígena. (RUBY, et al, 1995). Esta é considerada farmacologicamente segura (ZHENG et al, 2004). Um fator crítico no sucesso de agentes quimioterapêuticos está na sua habilidade de induzir apoptose em populações de células malignas. A curcumina inibe a proliferação de células tumorais por induzir apoptose em vários tipos de tumores, inclusive melanoma (BUSH, et al, 2001). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado sua habilidade em inibir inclusive a carcinogênese (MAHESHWARI, et al, 2006). Este trabalho visa o entendimento do mecanismo de ação da curcumina em células de melanoma humano da linhagem SKMEL 37, visto seu grande potencial terapêutico.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1-Cultura e manutenção das células

A linhagem de células de melanoma SKMEL 37 empregadas neste estudo foi obtida por doação do “Instituto Slon-Kettering (New York)”. As células foram mantidas em meio de cultura MEM com 10% de soro fetal bovino (Cutilab, Campinas, BRASIL), penicilina e fungizona (GIBCO BRL) rotineiramente em frascos de cultura (Nunclon) em incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### 2.2-Tratamento das células com curcumina (diferuloilmetano)

O tratamento das células foi feito após sua confluência nas placas de cultura. As células foram tratadas com diferentes concentrações de curcumina por 24 horas.

### 2. 2-Microscopia de luz

#### 2.2.1-Microscópio de luz comum

As células foram fixadas com 1 mL de metanol (MERK) e incubadas por 30 minutos. Logo, foram coradas com Giensa, visualizadas em microscópio de luz comum e fotografadas por câmera digital Nikon COLPIX 885.

#### 2.2.2-Microscopia de fluorescência: marcação do núcleo e citoplasma

As células foram incubadas com 0,2 mM de JC1 (5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolycarbocyanine iodide) por 15 minutos e lavadas com tampão PBS 2X. Adicionou-se DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate) e incubou-se por 30 minutos no escuro. As células foram lavadas e as lamínulas foram montadas em lâminas com glicerol e examinadas em microscópio de fluorescência Carl Zeiss.

## 2.3 Microscopia eletrônica

### 2.3.1-Microscopia eletrônica de transmissão

As células foram lavadas com PBS pH 6,4, ressuspensas e fixadas em 2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído tamponado em 0,1 M tampão de cacodilato de sódio pH 6,4 com 5% de sacarose por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com tampão cacodilato de cálcio e refixadas com tetróxido de ósmio, 1 %, pH 6,4 por 1 hora. Logo, as células foram desidratadas em séries crescentes de acetona e incluídas em resina "Spurr". Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Omega 912.

## 2.4-Citometria de fluxo

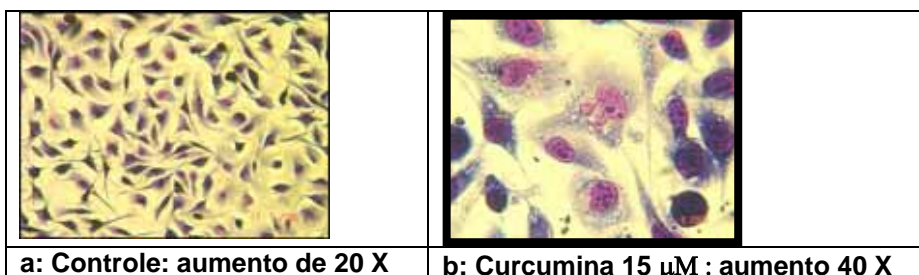
### 2.4.1-Avaliação do perfil do ciclo celular e apoptose

As células foram ressuspensas em etanol 70% (MERK) e centrifugadas por 5 minutos a 2800 rpm. Em seguida, as amostras foram ressuspensas 2 vezes em 1 mL de PBS 10X (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>O, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>O, H<sub>2</sub>O deionizada pH 7,2) e centrifugadas. Logo, as células foram ressuspensas em 200 µL de solução de iodeto de propídio (20mL PBS 1x, 20 µL Triton 0,1% - v/v, 400 µL RNase A 10 mg/mL), incubadas por 30 minutos protegidas da luz e analisadas em citômetro de fluxo.

## 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Curcumina induz alterações morfológicas e estruturais em SKMEL 37

A curcumina inibe a proliferação da linhagem de células de melanoma SKMEL 37 (RABELO, et al, 2002) induzindo previamente alterações morfológicas e estruturais. Nossos resultados parecem indicar que a curcumina induz morte celular por apoptose. Interessantemente, aspectos morfológicos como fragmentação do núcleo (Figura 1b) provenientes de morte por apoptose, foi observada inclusive no ensaio de microscopia óptica.

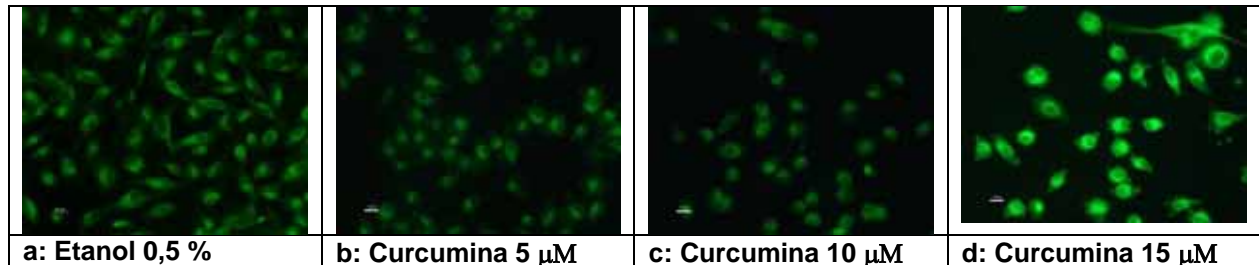


a: Controle: aumento de 20 X

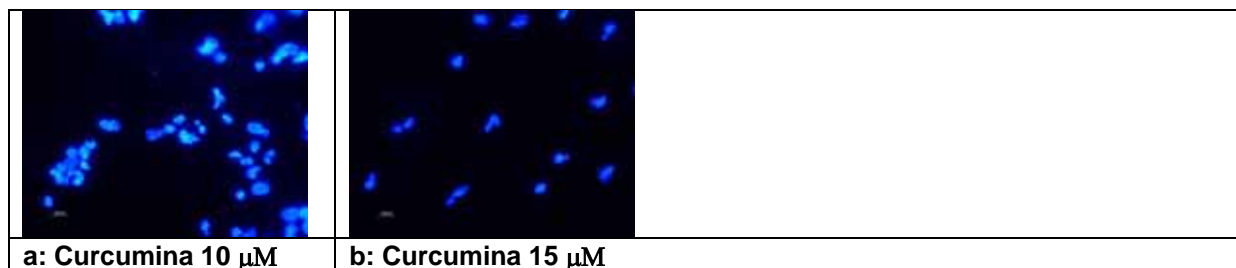
b: Curcumina 15 µM : aumento 40 X

**Figura 1: Aspectos morfológicos da linhagem de células de melanoma humano SKMEL 37. As células foram fixadas com metanol e coradas com Giensa conforme metodologia.**

A curcumina parece induzir alterações no citoesqueleto. As células tratadas com curcumina tornam-se mais arredondadas (Figura 2b e c) e na dose de 15  $\mu\text{M}$  ocorre formação de “blebs” de membrana (Figura 2d) Observamos fragmentação do núcleo (Figuras 3a e b) em células tratadas com as doses de 10 e 15  $\mu\text{M}$  de curcumina, característica evidente deste mecanismo de morte celular programada.



**Figura 2: Curcumina induz alterações do citoesqueleto e formação de ‘blebbs’ de membrana na linhagem SKMEL 37.** As células foram tratadas com diferentes doses de curcumina por 16 horas, incubadas com JC1 e visualizadas em microscópio de fluorescência.



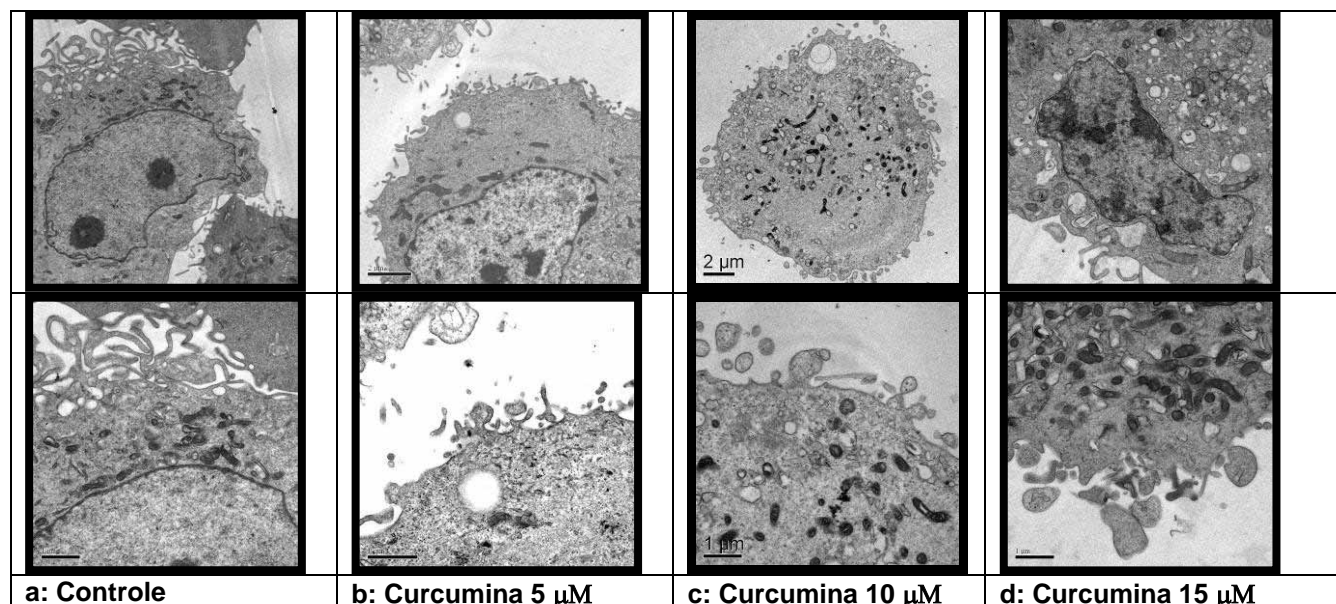
**Figura 3: Curcumina induz fragmentação do núcleo em células da linhagem SKMEL 37.** As células foram tratadas com 10 e 15  $\mu\text{M}$  de curcumina por 16 horas, incubadas com DAPI e visualizadas em microscópio de fluorescência.

Observações no microscópio eletrônico de transmissão mostraram que a curcumina induz alterações morfológicas no núcleo e na membrana plasmática. Detalhes ultraestruturais demonstram que a curcumina não induz alterações nas organelas citoplasmáticas. Todavia, observamos um intenso acúmulo de vacúolos em células tratadas com curcumina. A morte celular desencadeada por curcumina induz provavelmente um acúmulo de vacúolos autofágicos que pode estar relacionado com marcadores de apoptose.

SKMEL 37 são geralmente ricas em projeções de superfície de membrana (Figura 4a), contudo, após 24 horas com o tratamento da curcumina, além da redução destas projeções, observa-se formação de “blebbing” na superfície da membrana (4b, c e d). Também observamos segregação de porções de heterocromatina para a periferia do núcleo e formação de corpos apoptóticos (Figura 4d), características que confirmam o evento apoptótico nesta linhagem de células.

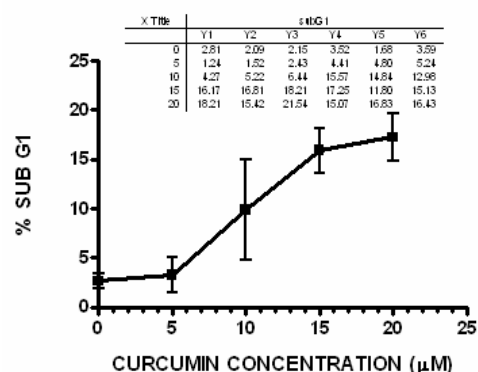
Os dados complementares obtidos através da análise da microscopia eletrônica de varredura foram essenciais para analisarmos a superfície das células (dados não mostrados). Células que não receberam tratamento com curcumina (controle) possuem muitas projeções citoplasmáticas e células tratadas com curcumina apresentaram “blebs” na superfície da membrana, dados que complementam a análise feita em microscopia eletrônica de transmissão.

**Figura 4: Micografias eletrônicas de transmissão de células da linhagem SKMEL 37. As células foram tratadas com curcumina por 24 horas.**

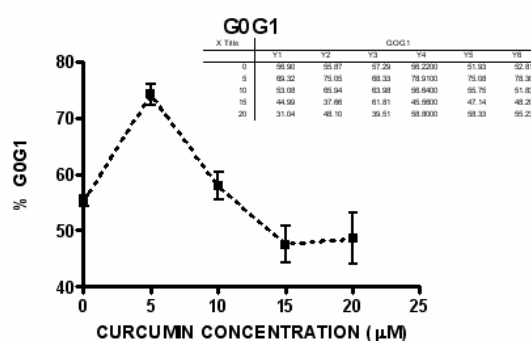


### **Indução de acúmulo na fase GoG1 do ciclo celular e hipodiploidia**

Neste estudo, nós avaliamos o efeito da curcumina na progressão do ciclo celular. A curcumina induziu significativa inibição da proliferação em células de melanoma humano. O percentual de células hipodiplóides foi proporcional à dose de curcumina (Figura 5). Células sem adição de curcumina (controle e etanol 0,5 %) apresentaram baixo percentual de hipodiploidia em relação às células tratadas com curcumina.



**Figura 5: Curcumina inibe a proliferação celular.** As células SKMEL 37 foram incubadas em triplicatas e tratadas com várias doses de curcumina por 24 horas. Os valores são mensurados de dois experimentos.



**Figura 6: Curcumina induz acúmulo no ciclo celular em G0G1 na dose de 5 μM.** As células SKMEL 37 foram incubadas em triplicatas e tratadas com várias doses de curcumina por 24 horas. Os valores são mensurados de dois experimentos

Nossos resultados demonstraram que este fitoquímico induziu acúmulo na sub-fase GoG1 (Figura 6) na dose de 5 μM, o que parece estar relacionado com o sistema de reparo das células. Observa-se que nas doses de curcumina mais

elevadas (10 e 15  $\mu\text{M}$ ), há um decréscimo na proporção de células em G0G1. Provavelmente, as células submetidas à doses mais elevadas de curcumina escapam dos pontos de checagem no ciclo celular, o que seria responsável pela sua progressão em G0G1 e posterior morte.

#### 4-CONCLUSÃO

A curcumina induz fragmentação do DNA e morte celular por apoptose. Este fitoquímico interfere na progressão do ciclo celular induzindo acúmulo de células em G0G1 na dose de 5  $\mu\text{M}$ , o que provavelmente está relacionado com o próprio sistema de reparo das células. A curcumina poderia ser considerada uma terapia potencial para pacientes com melanoma.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSH, J. A., CHEUNG, K-J. J, LI, G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. **Experimental Cell Research**, v. 271, p. 305-314, 2001.

MANS, D. R. A., ROCHA, A. B., SHWARTSMANN, G. Anti-Cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer Compounds. **The Oncologist**, v. 5, n. 5, p. 185

MAHESHWARI, R. K., SINGH, A K., GADDIPATI, J., SRIMAL, R.C. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life Sciences**, v. 78, p. 2081-2087, 2006.

ODOT, J., ALBERT, P., CARLIER, A., TARPIN, M., DEVY, J., MADOULET, C. In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells. **International Journal Cancer**, v. 111, p. 381-387, 2004.

RUBY, A. J., KUTTAN, G., BABU, D., RAJASEKHARAN, K.N., KUTTAN, R. Anti-tumor and antioxidant activity of natural curcuminóides. **Cancer Letters**, v. 94, p. 79-83, 1995.

RABELO, A. S., BRETAS, M. L., GUILLO, L. A. Ensaio da citotoxicidade da curcumina. In: Reunião Regional da SBBq. **Anais eletrônicos da VI Reunião Regional da SBBq (CD-ROM)**. Fortaleza, 2002.

ZHENG, M., EKMEKCIOGLU, S., WALCH, T. E., TANG C., GRIMM, A. E. Inhibition of nuclear factor kB and nitric oxide by curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells. **Melanoma Research**, v. 14, n. 3, 2004.

**FONTE DE FINANCIAMENTO:** CAPES e UFG.

**COLABORAÇÃO:** UnB e USP

<sup>1</sup> Bolsista de pós-graduação, nível mestrado (CAPES). Instituto de Ciências Biológicas (ICB II)-Laboratório de Bioquímica Celular, [marbretas@gmail.com](mailto:marbretas@gmail.com)

<sup>2</sup> Orientador/Instituto de Ciências Biológicas, UFG, [lidiaag@click21.com.br](mailto:lidiaag@click21.com.br)