

# CITOTIXICIDADE E INDUÇÃO DE APOPTOSE POR CURCUMINA

Matuda, Larissa<sup>1</sup>; GUILLO, Lídia Andreu<sup>2</sup>.

Instituto de Ciências Biológicas. [www.icb.ufg.br](http://www.icb.ufg.br)

Palavras-chave: melanoma humano; apoptose; curcumina

## 1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O melanoma maligno cutâneo é o tipo de câncer de pele que afeta um grupo de células conhecidas como melanócitos. (Perlis e Herlyn, 2004). Quando a exposição à radiação ultravioleta é excessiva, os melanócitos normais da pele podem sofrer uma série de transformações genéticas e morfológicas podendo levar à formação de tumor (Borges, 2003).

O açafrão (*Curcuma longa* L.) é uma planta herbácea de origem asiática pertencente à família das Zingiberáceas. Seu principal componente é a curcumina, um dos ingredientes responsáveis por sua atividade biológica. Essa substância está sendo usada para o tratamento de câncer, artrites, diabetes, doença de Crohn, doenças cardiovasculares, osteoporose, doença de Alzheimer, psoríases, entre outras patologias (Shishodia, et al., 2005).

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 - Cultura e manutenção das linhagens celulares

As células de melanoma humano utilizadas neste estudo são da linhagem SKMEL 37 (Doação do Slon-Kttering Institute, Nova York) e foram mantidas em meio de cultura MEM (Sigma) suplementados com 10% de soro fetal bovino (Cutilab), com penicilina (GIBCO BRL) e com fungizona (GIBCO BRL) rotineiramente em frascos em incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C.

### 2.2 - Visualização em Microscopia Óptica

Após tratadas, as células foram fixadas com metanol (na proporção 1:1) e coradas com 1 mL de Giemsa.

### 2.3 – Extração de DNA

A extração foi feita usando-se o protocolo de extração de DNA com fenol:clorofórmio após incubação com RNase (SIGMA) e Proteinase K (SIGMA). A análise de fragmentação do DNA foi feita em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio.

### 2.4 – Medida de atividade de desidrogenase mitocondrial (MTT)

As células foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas com curcumina por 48 horas. Ao término desse período, foram tratadas com MTT (5 mg/mL, SIGMA) e novamente incubadas a 37°C por 1 hora. A seguir, foi feita a leitura de absorbância a 570 nm em leitor de microplacas (Elx 800, Bio-Tek Instruments). O gráfico e o valor do IC<sub>50</sub> foram obtidos através do programa GraphPad Prism 4 for Windows.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As metodologias usadas apontam para a evidência de que a curcumina promove indução de apoptose nas células de melanoma humano da linhagem SKMEL-37. No caso dos tratamentos com curcumina, o número de células que permaneceram aderidas à placa de cultura diminuiu à medida que se aumentou

a concentração dessa substância, caracterizando-se um efeito antiproliferativo. Além disso, foram encontrados núcleos apoptóticos com condensação e fragmentação da cromatina, retração celular e formação de vacúolos intracitoplasmáticos, caracterizando-se assim morte por apoptose.

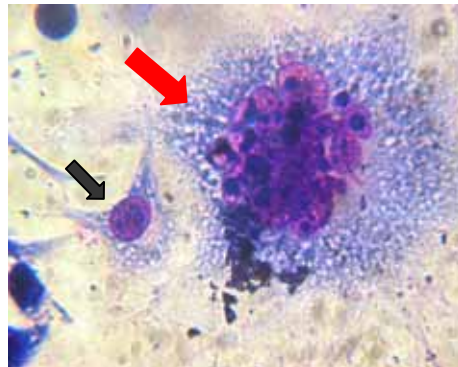


Figura 1. **Análise morfológica de células SKMEL 37 tratadas com curcumina 5  $\mu\text{M}$ .** As células foram incubadas por 24 horas com curcumina em concentração final no meio de cultura de 5  $\mu\text{M}$  e coradas com Giemsa. A seta preta indica uma célula normal com núcleo condensado e íntegro. A seta vermelha indica uma célula sofrendo apoptose, com núcleo extremamente fragmentado e tamanho aumentado em relação à célula normal.

Na análise do perfil eletroforético de fragmentação do DNA através do gel de agarose, visualizou-se o perfil de nucleossomos indicativo de apoptose na concentração de 25  $\mu\text{M}$ , como visto na Figura 2.

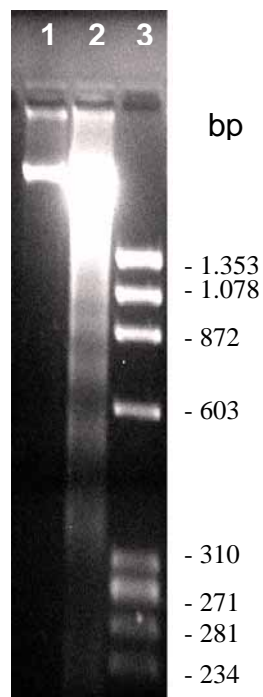
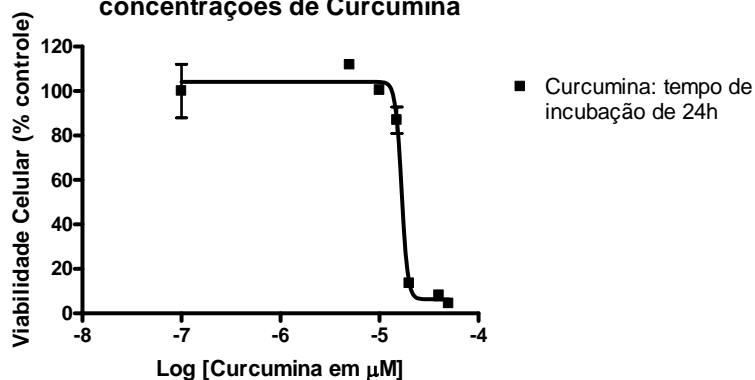


Figura 2. **Perfil eletroforético de fragmentação de DNA.** 1- DNA extraído das células não tratadas. 2- DNA extraído após tratamento das células com curcumina 25  $\mu\text{M}$  (como concentração final no meio de cultura) e incubadas por 24 horas, apresentando perfil de nucleossomos indicativo de apoptose. 3- Peso molecular HAE III Fragments (GIBCO).

O ensaio do MTT mostrou que a curcumina efetivamente afeta a integridade mitocondrial e a viabilidade celular, revelando um valor de IC<sub>50</sub> (concentração da substância capaz de promover 50 % de inibição das células *in vitro*) de 16,7 µM.

Gráfico 1 - Porcentagem de Viabilidade Celular de Melanoma Humano em diferentes concentrações de Curcumina



#### 4. CONCLUSÃO

Através dos experimentos realizados, foi comprovado o potencial citotóxico *in vitro* da curcumina em linhagem SKMEL-37 e sua ação antiproliferativa. O valor de IC<sub>50</sub> encontrado de 16,7 µM reflete a grande potencialidade terapêutica dessa substância. Esse valor é consideravelmente baixo e facilmente atingível pela corrente sanguínea após administração oral da curcumina, o que diminuiria os temidos efeitos adversos promovidos pelos fármacos de administração sistêmica.

Além disso, a curcumina é um fármaco encontrado naturalmente no açafrão e capaz de induzir apoptose em diversos tipos celulares, embora no melanoma poucos estudos foram realizados. A apoptose não leva a maiores complicações, como uma inflamação, o que ocorre na morte por necrose. (ROBBINS et. al., 2001), sendo portanto uma importante substância a ser explorada farmacologicamente na terapia antigênica, podendo constituir um tratamento eficaz para a cura do melanoma maligno.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PERLIS, C., HERLYN, M. Recent Advances in Melanoma Biology. **The oncologist**, vol. 09, p. 182 - 187, 2004.
- ROBBINS, STANLEY L.; COTRAN, RAMZI S.; KUMAR, VINAY; COLLINS, TUCKER. Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional. Guanabara Koogan. 6ª edição, p. 1 – 20, 2001.
- SHISHODIA, SHISHIR; SETHI, GAUTAM; AGGARWAL, BHARAT B. Curcumin: Getting back to thr roots. Texas, USA. 2005.

#### FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas - Laboratório de Biologia Celuar, [larissa.eetaow@gmail.com](mailto:larissa.eetaow@gmail.com)

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