



AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DE CURCUMINOIDES EM LINHAGENS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÃO HUMANO

Lorrane de S. Chaves¹; Esther A. N. Gonçalves¹; Gabriela A. de Souza²; Marco Edilson F. de Lima²; Raphael do C. Valente¹; Lúcia M. Previato¹; Leonardo Freire-de-Lima¹.

1- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

2- Instituto de Química (IQ), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

Palavras-chave: câncer, química medicinal, curcumina.

Introdução

É crescente o número de casos de cânceres no Brasil, bem como os gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) com tratamentos oncológicos que chegaram a R\$ 4 bilhões no ano de 2020. Neste mesmo ano, aproximadamente 600.000 novos casos foram registrados no Brasil, com 260.000 mortes, sendo o câncer de pulmão, o mais mortal entre homens e o segundo mais mortal em mulheres. Segundo o INCA, nas estimativas para o triênio 2023-2025, esses índices tendem a piorar. Os elevados custos com os tratamentos e os significativos efeitos adversos resultantes dos tratamentos usuais e invasivos para a terapia do câncer, como radioterapia, quimioterapia e cirurgia, corroboram com a necessidade da busca por novos medicamentos com reduzidos efeitos colaterais, fácil obtenção e baixo custo. Cerca de 80% dos medicamentos anticancerígenos desenvolvidos nos últimos 30 anos são oriundos de produtos naturais ou de seus derivados semi-sintéticos/sintéticos, o emprego de compostos naturais na prevenção e tratamento de doenças mostra-se promissor. Dentre os produtos naturais, algumas moléculas obtidas de plantas, como a curcumina, obtida do açafrão, têm apresentado resultados satisfatórios em estudos *in vitro*, demonstrando efeitos antiproliferativos e anticancerígenos. Devido as suas propriedades farmacológicas, estas moléculas, podem ser possíveis candidatas para a criação de novos fármacos para a terapia de diversos tipos de cânceres. Os objetivos principais deste trabalho foram a investigação da atividade citotóxica de 17 curcuminoides em células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549) e células saudáveis (leucócitos humanos) *in vitro* para e selecionar o IC₅₀ das 3 melhores moléculas e, realizar, assim, o ensaio de ciclo celular e morte celular das 3 melhores moléculas.

Material e Métodos

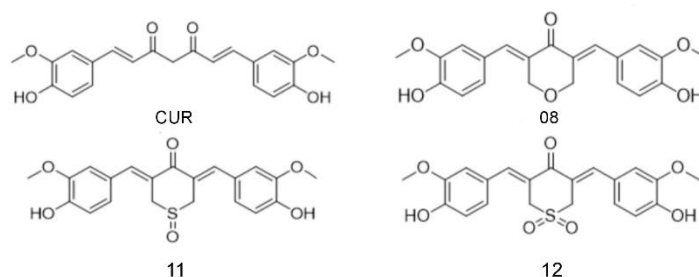
Os curcuminoides presentes no rizoma da *Curcuma longa* brutos ou isolados (curcumina bruta (CUR), curcumina pura, desmetoxicurcumina, bisdesmetoxicurcumina) quanto os análogos da curcumina foram fornecidos pela equipe do Professor Marco Edilson Freire de Lima (UFRRJ). As células A549 foram mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em frascos de cultura de 75 cm², incubadas em estufa úmida contendo 4% de CO₂ a 36 °C. Para o ensaio de viabilidade celular por MTT, as linhagens A549 foram plaqueadas na densidade de 1x10⁴ células/poço em placa de 96 poços, após 24 h, as células aderidas foram tratadas com os 17 curcuminoides na concentração de 200 a 0,09 µM por 72 h (controle negativo - células sem tratamento em DMEM e SFB 10%), desprezou-se o sobrenadante e se adicionou-se 200 µL do MTT dissolvido em PBS (5 mg/mL), incubando-se por 3 h. Após, o meio foi desprezado e adicionou-se DMSO para solubilização dos cristais de formazan. Agitou-se as placas por 5 min e a absorbância das amostras mensuradas por espectrofotometria em leitor de ELISA (AD340S ESALAB) a 570 nm. Realizou-se outro ensaio de MTT, nas mesmas concentrações prévias, agora frente a células humanas sadias (leucócitos), para observação da citotoxicidade destes derivados. As amostras enriquecidas em leucócitos foram obtidas da camada leucoplaquetária de sangue de

vários doadores (Banco de Sangue do HUCFF – UFRJ) e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CAAE 48,917,418.2.0000.5257) estabelecido pelo Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro/HUCFF- UFRJ. Após as avaliações dos ensaios de viabilidade celular, foi possível obter o valor de IC₅₀ de todas as moléculas. Para análise de ciclo celular, as células de A549 foram plaqueadas na densidade 1x10⁶ células/poço em placas de 6 poços, após o tratamento por 72h com os curcuminoides mais ativos, as células foram centrifugadas a 200×g por 7 min, o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de solução de ciclo contendo iodeto de propídeo (PI), RNase e Triton X-100 e diluída 5x em PBS. Após incubação por 10 min à temperatura ambiente, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur). A porcentagem de células em cada ciclo celular é proporcional à intensidade da fluorescência do iodeto de propídeo em unidades arbitrárias, onde a mesma é diretamente relacionada com a quantidade de DNA em cada célula. Já para a análise de morte celular foram utilizados marcadores de apoptose e necrose celular através do kit FITC anexina V e PI, para o ensaio, as células foram plaqueadas na densidade 1x10⁶ células/poço em placas 6 poços. Após o tratamento por 48h com o curcuminóide mais ativo, as células foram centrifugadas a 200×g por 5 min e o precipitado ressuspenso em 100 µL em solução de morte celular contendo anexina, anexina FITC e PI, incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se 400 µL do tampão de anexina, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur). Após a análise com programa (Summit v.4.3) foi possível calcular o percentual de células normais, células em necrose e apoptose. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Resultados e Discussão

A fim de avaliar o potencial dos curcuminoides frente a redução da viabilidade celular de linhagens tumorais humanas, realizou-se um screening utilizando o ensaio de MTT após tratamento na concentração de 200 a 0,09 µM dos 17 curcuminóides por 72 horas. As duas linhagens avaliadas apresentaram redução significativa da viabilidade celular em diferentes concentrações. Após a avaliação da viabilidade celular, foi possível obter o IC₅₀ de todas as moléculas testadas. Dentre as 17, 3 se mostraram com efeitos antitumoral muito promissores, são elas:

Tabela 1. Valor de IC₅₀ (µM) da CUR e seus derivados sintéticos frente a células humanas tumorais e sadias (leucócitos).



Molécula	A549	Leucócitos
CUR	43,01 µM	134,13 µM
08	10,20 µM	146,31 µM
11	8,20 µM	138,36 µM
12	6,99 µM	104,95 µM

A análise do ciclo celular mostrou que a proporção de células na fase G₀/G₁ diminuiu drasticamente nos grupos tratados com CUR, 08, 11 e 12 em comparação com o grupo



controle. A proporção de células na fase G2/M de todos os curcuminoides foi significativamente maior quando comparados ao grupo controle, observou-se, também, que a proporção de CUR foi ligeiramente maior do que nos demais tratamentos. No entanto, ao analisar a fase sub-G0, os curcuminoides 08, 11 e 12, apresentaram uma maior proporção de células quando comparados a CUR e ao controle. Esses resultados mostram que todos os curcuminoides inibiram efetivamente a proliferação de células A549, entretanto, as moléculas 08, 11 e 12, além de induzir uma parada no ciclo celular, possuem um forte indício sobre indução de apoptose, de acordo com a quantidade celular presente na fase sub-G0. O que pode indicar uma assinatura fenotípica distinta da CUR e que seus mecanismos de regulação podem ser diferentes. A análise de morte celular mostrou que a principal causa de morte celular causada pelo 12 foi por apoptose (19%). Os dados de morte e ciclo celular estão de acordo com os dados obtidos na literatura para a molécula de CUR nesta linhagem tumoral, sendo um forte indicador de que as demais moléculas também possam apresentar essas características de forma mais acentuada.

Conclusões

Após a avaliação do IC₅₀ de 17 curcuminoides, 3 foram escolhidos, por ter um efeito antitumoral promissor com certa seletividade para a linhagem A549 quando comparada a linhagem sadia. Observou-se, nessas moléculas, tanto a parada do ciclo celular quanto a indução apoptótica podendo, assim, serem possíveis candidatos à medicamento antitumoral.

Agradecimentos

Às agências de fomento: CAPES, CNPq, FAPERJ e Fundação do Câncer.

Referências

SUNG, H. et al. *CA Cancer J Clin* (2021), 71, p. 209-249.

ARRAES, C. *Real Instituto de Oncologia* (2011), disponível em: <<https://realinstitutodeoncologia.com.br>>

STOLL, S. N. *Avaliação da atividade biológica de um terpeno em linhagem de câncer de pulmão de pequenas células (A549)*. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade do Vale do Taquari – Univates. Lajeado, 2018.