

## Extrato etanólico de açafrão (*Curcuma longa* L.) reduz apoptose e promove proliferação de células de osteossarcoma canino

*Turmeric ethanol extract (Curcuma longa L.) reduces apoptosis and promotes canine osteosarcoma cell proliferation*

Naira Moura Alves<sup>1</sup>, Vanessa de Sousa Cruz<sup>2</sup>, Leandro Lopes Nepomuceno<sup>2</sup>, Nayane Peixoto Soares<sup>3,4</sup>, Emmanuel Arnhold<sup>1</sup>, Daniel Graziani<sup>1</sup>, Patrícia de Almeida Machado Gonçalves<sup>1</sup>, Guilherme Henrique Salazar Badan<sup>1</sup>, Amanda da Matta Santos<sup>1</sup>, Eugênio Gonçalves de Araújo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil

<sup>2</sup>Centro Universitário Católica do Leste de Minas Gerais (UNILESTE), Coronel Fabriciano, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup>Centro Universitário Cambury (Unicambury), Goiânia, Goiás, Brasil.

<sup>4</sup>Centro Universitário Alfredo Nasser (UNIFAN), Goiânia, Goiás, Brasil.

\*Correspondente: [earaujo@ufg.br](mailto:earaujo@ufg.br)

### Resumo

A *Curcuma longa* L., planta conhecida popularmente como açafrão, tem sido amplamente estudada por suas diversas propriedades terapêuticas, incluindo a ação antineoplásica. O extrato etanólico da planta contém diversos compostos fenólicos, com destaque para a curcumina. O osteossarcoma é um tumor ósseo predominante em cães e humanos, caracterizado por apresentar alto potencial metastático e prognóstico desfavorável. Procurou-se investigar os efeitos de diferentes concentrações de curcumina do extrato etanólico de açafrão sobre células de osteossarcoma canino de cultura estabelecida. As células foram cultivadas e submetidas ao tratamento com extrato com diferentes concentrações de curcumina (0, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM e 1000 µM) e tempos de exposição (24h, 48h e 72h) pelo EEA. Inicialmente, foram realizados: técnica de redução do tetrazólio (MTT) e cálculo da IC<sub>50</sub>. Posteriormente, após o tratamento com o extrato, realizou-se o ensaio de imunocitoquímica para verificar a expressão de p53 mutada e estudar o potencial proliferativo das células malignas; Bcl-2, com intuito de averiguar o estímulo de via antiapoptótica; e o marcador Ki-67, que sinaliza aumento no grau de malignidade. O extrato promoveu proliferação de células de osteossarcoma canino, com incremento de até 3819,74% na concentração de 50µM de curcumina. O composto também alterou a expressão das proteínas p53 mutante e Ki-67 significativamente, mas não alterou a expressão de Bcl-2, mostrando que não induziu a via antiapoptótica mediada por esta. Estes resultados demonstram que o extrato etanólico do açafrão apresenta potencial proliferativo sobre células de osteossarcoma canino, sugerindo a necessidade de conscientização e conhecimento dos reais efeitos de determinados compostos naturais, considerados seguros ao serem utilizados como tratamento de diversas enfermidades.

**Palavras-chave:** compostos naturais; D-17; neoplasias ósseas; segurança terapêutica

### Abstract

*Curcuma longa* L., also known as turmeric, has been widely studied for its various therapeutic properties, including antineoplastic action. The ethanolic extract of the plant contains several phenolic compounds, especially curcumin. Osteosarcoma is a predominant bone tumor in dogs and humans, characterized by high metastatic potential and an unfavorable prognosis. The aim of this study was to investigate the effects of turmeric ethanol extract on canine osteosarcoma cells from established culture. The cells were cultured and treated with different curcumin concentrations (0, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, and 1000 µM) and exposure times (24h, 48h, and 72h). We first performed tetrazolium reduction technique (MTT) assay and calculated IC<sub>50</sub>. An immunocytochemistry assay was performed after extract treatment to verify the expression of mutated p53 and therefore study the proliferative potential of malignant cells; Bcl-2 and Ki-67 were used to assess apoptosis and the degree of malignancy, respectively. The extract enhanced the proliferation of canine osteosarcoma cells, reaching 3,819.74% at 50 µM of curcumin. The extract also significantly altered the expression of mutated p53 and Ki-67 proteins but not that of Bcl-2, suggesting that it did not induce this antiapoptotic pathway. Overall, these results are prerequisite to better understanding how natural compounds such as turmeric ethanolic extract affect cell proliferation and could be used to treat various diseases.

**Keywords:** bone neoplasms; D-17; natural compounds; therapeutic safety

Recebido: 3 de maio de 2022. Aceito: 5 de agosto de 2022. Publicado: 15 de setembro de 2022.



## Introdução

Os produtos naturais derivados de plantas destacam-se entre as fontes mais promissoras para a produção de medicamentos<sup>(1,2)</sup>. O Cerrado, segundo maior bioma do Brasil e rico em plantas utilizadas na medicina popular, é considerado um *hotspot* global para a conservação da biodiversidade devido à sua riqueza de espécies e rápida perda de habitats<sup>(3)</sup>. A disponibilidade das plantas favorece o uso de produtos naturais como fonte terapêutica<sup>(4)</sup>.

Estudos recentes apontam que 25% da prescrição mundial de medicamentos é derivada de plantas, e dentre os 252 medicamentos que compõem a lista de fármacos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são de origem totalmente vegetal<sup>(5,6)</sup>. Embora existam várias vantagens no uso de compostos secundários de plantas, substâncias presentes em suas composições podem ser prejudiciais à saúde. Ainda, a utilização de tais compostos requer estudos mais detalhados que possam avaliar mecanismos farmacológicos e seus possíveis efeitos deletérios<sup>(7)</sup>, além de definir qual composto de fato é responsável por cada ação terapêutica, em razão do elevado número de moléculas usualmente presentes em um só extrato<sup>(8,9)</sup>. Conforme as condições de obtenção, preparo ou conservação, o produto final pode não representar, de maneira fidedigna, a real composição fotoquímica da planta<sup>(10)</sup>.

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) pertence à família de Zingiberaceae, gênero *Curcuma*. É uma planta popularmente conhecida como açafrão, que se caracteriza como uma cultura de colheita abundante e floração perene. Trata-se de um condimento alimentar apreciado e amplamente utilizado no mundo por conferir cor e sabor aos alimentos, tendo sua origem no sudeste da Ásia, nas florestas tropicais da Índia, maior fornecedor mundial<sup>(11,12)</sup>. No Brasil, o Centro-Oeste, particularmente a região de Mara Rosa - GO, é a que mais se destaca na produção e consumo do açafrão, cujo teor de curcumina, a molécula com efeitos terapêuticos mais característica desta planta, apresenta o significativo teor médio de 6,8%<sup>(13)</sup>.

Os efeitos terapêuticos do açafrão e seus componentes curcuminóides já foram demonstrados em diversos estudos, dentre eles: a redução da lipogênese, ação antipruriginosa, anti-inflamatória, anticancerígena, analgésica, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antioxidante e antineoplásica<sup>(14-18)</sup>. De fato, a curcumina tem sido amplamente utilizada e comercializada como alternativa fitoterápica para doenças inflamatórias ósseas em pacientes caninos<sup>(19)</sup> e humanos<sup>(20)</sup>. Porém, ainda há muito a ser esclarecido acerca dos mecanismos e vias de sinalização envolvidas nas ações celulares do açafrão.

Em experimento anterior, este mesmo grupo de

pesquisa já determinou que a curcumina, em sua forma pura, promoveu atividade antitumoral em células de osteossarcoma canino (OC) por meio de apoptose extrínseca, ativando as vias da quinase JNK e da caspase-3 e mediada pela via de transdução de sinal da cAMP/AMPK. Além disso, a curcumina determinou a redução da expressão da forma mutante da proteína p53 sem interferir na via de autofagia do AKT/mTOR<sup>(18)</sup>. Todavia, outros compostos presentes no extrato total do açafrão, como os fenóis, possuem efeitos antioxidantes benéficos de neutralizar radicais livres de oxigênio<sup>(21)</sup> e poderiam interferir com a capacidade antiapoptótica da curcumina.

O OC é uma neoplasia agressiva que representa até 85% de todos os tumores ósseos em cães. A maioria dos crescimentos tumorais se origina na região metafisária dos ossos do esqueleto apendicular. Os fatores de risco relatados para o desenvolvimento de OC incluem sexo, raça, história de trauma e situação de castração. As cadelas apresentam menor risco, enquanto cães de raças grandes e gigantes (> 25 kg) estão em maior risco. Os animais afetados geralmente apresentam claudicação e inchaço, além de risco de fratura patológica, preferencialmente no fêmur. Devido à alta taxa global de metástases, o prognóstico no OC canina é ruim. Com o tratamento consistindo em amputação e quimioterapia de acompanhamento (adjuvante), o intervalo livre de doença e os tempos de sobrevida global são tipicamente 291 e 284 dias, respectivamente. Como as alternativas terapêuticas pouco evoluíram nas últimas décadas, é urgente que surjam novos avanços no tratamento do OC<sup>(22)</sup>.

As mutações de genes supressores de tumores estão potencialmente relacionadas com a proliferação e migração de células neoplásicas, ocasionando as metástases<sup>(23)</sup>. Os agentes terapêuticos ideais são aqueles capazes de reduzir a proliferação e induzir apoptose nas células tumorais, reduzindo seu potencial maligno e favorecendo a sobrevida dos animais<sup>(18)</sup>.

O presente estudo teve por objetivo investigar a ação do extrato etanólico da *Curcuma longa* L. (EEA) proveniente da região de Mara Rosa (Goiás, Brasil), em células de osteossarcoma canino e analisar a expressão de biomarcadores na progressão desta neoplasia.

## Material e métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório Multiusuário de Avaliação de Moléculas, Células e Tecidos, na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

*Obtenção do extrato etanólico do açafrão – EEA (Curcuma longa L.)*

Foi utilizado um extrato etanólico de açafrão

preparado anteriormente em outros experimentos deste grupo de pesquisa<sup>(24)</sup>. Os rizomas da *Curcuma longa* L. foram provenientes da Cooperativa de Produtos do Açafrao de Mara Rosa (Cooperaçafrao), localizada no Município de Mara Rosa, estado de Goiás, Brasil.

O processamento de obtenção do extrato bruto iniciou-se com a retirada dos rizomas da terra, com posterior lavagem e secagem em estufa para serem processados. Posteriormente, 100 g do material seco e triturado foi adicionado a 1000 ml de etanol absoluto, que em seguida passou por percolação a frio. O sobrenadante foi filtrado e o solvente evaporado em rotoevaporador (IKA® RV 05 Basic)<sup>(25)</sup>.

Análises prévias revelaram a composição do extrato utilizado nesta pesquisa<sup>(24)</sup>. O EEA apresentou teor médio de 16,7% de curcumina em sua composição, conforme mensurado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) fluorescente. O teor total de compostos fenólicos, obtido por meio de curva padrão de ácido gálico (equivalente em ácido gálico - EAG), foi determinado em 691,49 mg de EAG/100 g. Por meio da medida da capacidade de descoloração do reagente DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil), obteve-se a capacidade de o extrato de sequestrar radicais livres, calculada com a utilização de um reagente padrão (Trolox) equivalente à vitamina E. Assim, O EEA possui atividade antioxidante de 18,45 µM Trolox/g amostra), a porcentagem de descoloração do DPPH é de 55% e a IC<sub>50</sub> (18,1 µg/mL).

O extrato bruto obtido foi armazenado em refrigerador, com todas as etapas protegidas da fotodegradação.

#### Cultivo celular

As células de osteossarcoma osteogênico metastático canino (D-17, BCRJ 0276, lote 000573, passagem 239, espécie *Canis familiaris*), originárias da ATCC (American Type Culture Collection -Manassas, VA, USA), foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ -Rio de Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco modificado de Eagle (DMEM Thermo Fischer, Waltham, MA, EUA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomina (10.000 U.I./ml -10 mg/ml), anfotericina B e L glutamina (todos os reagentes da Cultilab, Campinas, Brasil) e mantidas em incubadora umidificada a 37 °C com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Ensaio da viabilidade e citotoxicidade celular

Ao término da etapa de cultivo, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços com 200 µL de meio DMEM, na concentração de 1x10<sup>4</sup> por poço. As placas foram

mantidas em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Depois, o meio foi desprezado e os poços tratados ou não com o EEA diluído em 1% de DMSO (dimetil sulfoxido). Foram preparadas diferentes diluições do extrato nas concentrações de curcumina de 0, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM e 1000 µM (Tabela 1), considerando a massa molecular da curcumina (368,38g/mol) e sua concentração no EEA de 16,7%. As células foram expostas ao EEA nos tempos de 24, 48 ou 72 horas. O grupo controle (GC) ou negativo foi tratado unicamente com DMSO. Os poços foram tratados de forma aleatória e a técnica foi realizada em quintuplicata, com três experimentos independentes.

**Tabela 1.** Estratégia de diluição do extrato etanólico de açafrao (*Curcuma longa*, L.) em diferentes concentrações molares de curcumina, conforme peso molecular (368,38 g/mol) e o teor de curcumina do extrato (16,7%)<sup>(24)</sup>. DMSO - dimetil sulfoxido, diluente do extrato bruto. DMEM - meio de cultura Dulbecco modificado de Eagle

Concentração de Curcumina (µM)	Extrato Bruto semi-sólido (mg)	Solução de Diluição	
		DMSO (µL)	DMEM (µL)
0	0	4000	6000
10	6	4000	6000
20	12	4000	6000
50	31	4000	6000
100	59	4000	6000
1000	590	4000	6000

Após o período de tratamento, realizou-se a técnica de redução do sal de tetrazólio (MTT) visando o complexo enzimático piruvato desidrogenase, presente na matriz de mitocôndrias. O meio foi descartado e adicionados 10µl de tetrazólio (MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-diphnyl-2H-tetrazólio) em cada poço. As placas foram incubadas por três horas. A fim de encerrar a reação, acrescentou-se 50µl de dodecil sulfato de sódio (SDS - Vivantis Biochemical) a 10% diluído em HCl (0,01 N) por poço e as placas permaneceram incubadas por 24 horas em temperatura ambiente. A densidade óptica foi quantificada em espectrofotômetro (Awareness Technology Ine/ Stat Fax 2100, 425 nm - 540 nm, Palm City, FL, EUA). Utilizaram-se três comprimentos de onda para melhor discriminar os valores de absorvância obtidos no espectrofotômetro, pois o tamanho das moléculas, densidade, diluição e outros fatores podem influenciar as propriedades físicas das amostras e, assim, interferir diretamente no comprimento de onda ideal<sup>(26)</sup>.

A viabilidade celular foi determinada pela equação:

$$VC = \frac{abs_{tratamento}}{abs_{controle}} \times 100$$





onde VC é a viabilidade celular e abs é a absorbância. Os dados utilizados foram provenientes de três estudos independentes. As comparações foram conduzidas utilizando análise de variância e o teste de Tukey, com nível de 5% de significância, *software* R e pacote R *easynova*, como descrito anteriormente<sup>(18)</sup>.

### Imunocitoquímica

As células D-17 foram semeadas em lâminas de cultura com câmara Falcon™ (Corning, Glendale, EUA), na concentração de  $1 \times 10^4$ , cultivadas e expostas ao EEA por 48 horas, nas concentrações estudadas (0, 10, 20, 50, 100 e 1000  $\mu$ M). Após este período, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos.

Todas as etapas da técnica foram executadas utilizando-se o processador automático *Bond-Max* (Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha), com os reagentes: *Bond Polymer Refine Detection*, *Bond Wash Solution*, *Bond Epitope Retrieval 1*, *Bond Dewax Solution* e *Bond Epitope Retrieval 2*, *Bond DAB* (cromogênio 3,3'-diaminobenzidina) e hematoxilina. Os anticorpos utilizados foram o anti-Bcl-2, anti-p53 (SC71785 monoclonal de camundongo) e anti-Ki-67, em diluições de 1:500 em 1,5% de albumina sérica bovina (BSA). Um grupo isento do anticorpo primário foi utilizado como controle da reação.

Para avaliar a imunomarcagem, foi feita a contagem total de células em cinco campos distintos e a porcentagem de células positivas marcadas pelo anticorpo, procedimento adaptado de Fedchenko & Reifenrath<sup>(27)</sup>. Para estabelecer o escore da intensidade da expressão (EIE), foi feita análise semiquantitativa às cegas, com a utilização dos escores de 0 a 3, conforme astonalidades de uma escala colorimétrica<sup>(18)</sup> (Figura 1). A relação de células marcadas positivamente (RCMP) foi calculada pela razão entre o número de células marcadas e o número total de células, multiplicado por 100. Com esse valor, atribuíram-se as categorias 0 para 0%; 1 para <1%; 2 para 1-10%, 3 para 11-33%, 4 para 34-66% e 5 para >67%. Em seguida, adotou-se o sistema de pontuação combinada semiquantitativa (SPCS), definido pelo somatório da RCMP com o EIE, após o cálculo da média, desvio padrão e exclusão de *outliers*. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância e o teste Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ , *software* R® (R Core Team) e pacote R *easynova*<sup>(18)</sup>.

Escore	Sem marcação	Fraca	Intermediária	Forte
	0	1	2	3
Marcação				

**Figura 1.** Tons de referência para a atribuição dos escores às diferentes intensidades de marcação por anticorpos na análise imunocitoquímica. Adaptado de Soares et al.<sup>(18)</sup>, sob permissão.

## Resultados

### Ensaio da viabilidade e citotoxicidade celular

O experimento foi realizado com diferentes concentrações e tempos de exposição para determinar se o EEA poderia modificar a viabilidade das células D-17. As médias dos tratamentos e os tempos de exposição foram comparadas, sendo possível observar que o composto exibiu efeito proliferativo significativo exponencial até alcançar a concentração de 50  $\mu$ M. Ao ultrapassar essa concentração, ocorreu declínio no efeito proliferativo, não havendo diferença estatística entre os tempos de exposição ao extrato, como evidenciado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Média dos valores de viabilidade celular obtidas pelas médias da espectrofotometria em ondas 496, 540 e 570 nm para as células de osteossarcoma canino da linhagem D-17, tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de açafrão (*Curcuma longa*, L.) em diferentes tempos de exposição

Exposição (h)	Concentração ( $\mu$ M)	Viabilidade Celular (%)	Tukey
24 <sup>AB</sup>	0	100	d
	10	321,48	d
	20	625,28	cd
	50	3654,62	a
	100	2097,53	b
	1000	1262,41	c
48 <sup>A</sup>	0	100	d
	10	313,56	d
	20	297,94	d
	50	3945,09	a
	100	3000,44	b
	1000	1831,8	c
72 <sup>B</sup>	0	100	c
	10	197,88	c
	20	267,97	c
	50	3859,52	a
	100	2672,73	b
	1000	542,51	c

Este efeito pôde ser mais bem compreendido quando se obteve uma média dos valores da proliferação celular nos três tempos experimentais em relação às concentrações utilizadas, conforme mostrado na Tabela 3.

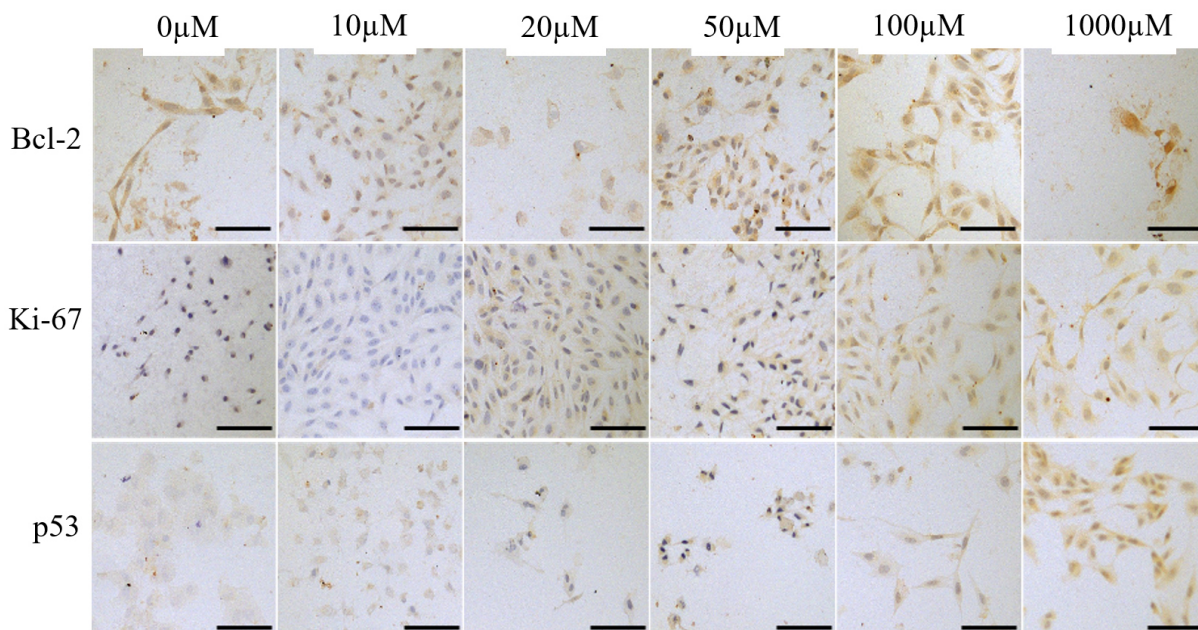
**Tabela 3.** Média dos valores de viabilidade celular obtidos por meio da absorbância gerada pela média da espectrofotometria em ondas 496, 540 e 570 nm para as células de osteossarcoma canino da linhagem D-17, do grupo controle e tratadas com 0, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1000  $\mu$ M do extrato etanólico de açafrão (*Curcuma longa*, L.).

Concentração ( $\mu$ M)	Viabilidade Celular (%)	Tukey
0	100	d
10	277,65	d
20	397,07	d
50	3819,74	a
100	2590,23	b
1000	1212,24	c

Para possibilitar melhor compreensão de processos celulares envolvidos na progressão da viabilidade celular observada, utilizou-se a imunocitoquímica automatizada. No caso do Bcl-2, marcador anti-apoptótico, notou-se que a intensidade de expressão, medida por meio do SPCS de Fedchenko & Reifenrath<sup>12</sup>, não se alterou significativamente com o aumento da concentração do extrato, atingindo seu máximo em 50  $\mu$ M de curcumina (Tabela 3 e Figura 2). Já no caso da proteína p53 mutante, incapaz de controlar a proliferação celular independente, também houve elevação progressiva, até o máximo atingido na concentração no EEA de 1000  $\mu$ M de curcumina (Tabela 4 e Figura 2). Este comportamento foi idêntico ao observado em relação à Ki-67, um marcador de malignidade tumoral (Tabela 3 e Figura 2).

**Tabela 4.** Escores atribuídos e sistema de pontuação combinada semiquantitativa de Fedchenko & Reifenrath<sup>12</sup> em lâminas com células de osteossarcoma canino da linhagem D-17 tratadas com o extrato etanólico de açafrão (*Curcuma longa*, L.). As células foram marcadas pelos anticorpos: anti Bcl-2, KI-67 ou p53 mutada e contra coradas com hematoxilina, tendo sido realizadas análises estatísticas independentes (análise de variância e o teste Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ) para cada anticorpo. Imunocitoquímica automatizada em equipamento Bond Max.

Anticorpo	Concentração de Curcumina no Extrato Etanólico de Açafrão ( $\mu$ M)	Relação de Células Marcadas Positivamente	Escore da Intensidade de Expressão	Sistema de Pontuação Combinada Semiquantitativa
Bcl-2	0	5	2.1029 <sup>a</sup>	7.1029 <sup>a</sup>
	10	5	1.8750 <sup>a</sup>	6.8750 <sup>a</sup>
	20	5	1.4444 <sup>a</sup>	6.4444 <sup>a</sup>
	50	5	2.7500 <sup>a</sup>	7.7500 <sup>a</sup>
	100	5	2.5000 <sup>a</sup>	7.5000 <sup>a</sup>
	1000	5	2.2250 <sup>a</sup>	7.1000 <sup>a</sup>
p53	0	5	1.0441 <sup>b</sup>	6.0441 <sup>b</sup>
	10	5	1.4500 <sup>ab</sup>	6.4500 <sup>ab</sup>
	20	5	1.1111 <sup>b</sup>	6.1111 <sup>b</sup>
	50	5	1.6750 <sup>ab</sup>	6.6750 <sup>ab</sup>
	100	5	1.9000 <sup>ab</sup>	6.9000 <sup>ab</sup>
	1000	5	2.9000 <sup>a</sup>	7.9000 <sup>a</sup>
Ki-67	0	5	1.5588 <sup>ab</sup>	6.5588 <sup>ab</sup>
	10	5	0.8250 <sup>b</sup>	5.8250 <sup>b</sup>
	20	5	1.5000 <sup>ab</sup>	6.5000 <sup>ab</sup>
	50	5	2.2500 <sup>a</sup>	7.2500 <sup>a</sup>
	100	5	2.1500 <sup>ab</sup>	7.1500 <sup>ab</sup>
	1000	5	2.6000 <sup>a</sup>	7.6000 <sup>a</sup>



**Figura 2.** Imagens de células de osteossarcoma canino da linhagem D-17 tratadas com diferentes concentrações de extrato etanólico de açafrão (*Curcuma longa*, L.) e marcadas com anticorpos anti Bcl-2, Ki-67 ou p53 mutada e contra coradas com hematoxilina. Não há diferença na intensidade de marcação do anticorpo Bcl-2. No entanto, houve aumento da intensidade de marcação de Ki-67 e de p53 mutada com o aumento da concentração do extrato, mostrando efeito positivo na progressão da neoplasia. Imunocitoquímica automatizada com equipamento Bond Max. As barras correspondem a 100 µm. Os escores atribuídos foram submetidos a análise estatística e descritos previamente na Tabela 3.

## Discussão

Neste trabalho, utilizou-se o extrato etanólico da *Curcuma longa* L. (açafrão) e obtiveram-se resultados relevantes. Além de não haver estudos progressos deste extrato sobre células de osteossarcoma canino, também não há pesquisas que mostram possíveis efeitos proliferativos nesta ou em outra linhagem de células cancerígenas, pois os relatos em destaque sobre extrato etanólico da *C. longa* L. se referem quase exclusivamente a seus efeitos benéficos. Este fato provavelmente está relacionado à baixa toxicidade da planta e seus componentes isolados, o que é corroborado pelos relatos de um estudo retrospectivo da toxicidade do açafrão e de seu principal componente, a curcumina, nos quais a administração em humanos de 3,6 g de curcumina por via oral por dia durante seis meses ou de 4 g extrato de açafrão fermentado durante 12 semanas foi segura, sem a ocorrência de toxicidade<sup>(28)</sup>.

Em oposição ao que foi descrito nesta pesquisa, são abundantes os relatos que destacam a eficácia contra o câncer dos constituintes do açafrão, particularmente a curcumina. Os resultados, em geral, têm sido bastante favoráveis e promissores, uma vez que, além da atividade antiproliferativa e anticancerígena em estudos pré-clínicos, raros efeitos adversos tem sido descritos em células normais<sup>(28-30)</sup>. Em contraste com os achados

citados acima, os resultados do ensaio de viabilidade celular pela redução do sal de tetrazólio (Figura 2) evidenciam o efeito proliferativo provocado pelo EEA nas células D-17. O grupo que apresentou maior percentagem de viabilidade celular foi o que recebeu 50 µM, tendo havido declínio na proliferação celular em concentrações mais elevadas. O tempo de exposição do extrato não influenciou os resultados obtidos.

Em virtude deste grupo haver relatado em trabalho anterior que a curcumina provocou apoptose extrínseca em células D-17<sup>(18)</sup>, esperava-se neste experimento efeito similar com o EEA em células da mesma linhagem, o que não se concretizou. Já foi descrito que a curcumina pode induzir apoptose intrínseca e extrínseca em diferentes linhagens de células tumorais, além de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que resulta em regulação positiva dos receptores de apoptose na membrana da célula tumoral; a curcumina também pode regular a expressão e a atividade de p53 nativa, que inibe a proliferação de células tumorais e aumenta a apoptose, além de apresentar potente efeito inibitório sobre a atividade de NF-κB e COX-2, que estão envolvidos na superexpressão de genes anti-apoptóticos, como Bcl-2<sup>(31)</sup>. Mais especificamente, em células de osteosarcoma MG-63 a curcumina inibiu o crescimento e induziu a apoptose por meio de ativação da caspase-3 e redução os

níveis de expressão de Bcl-2, além de haver induzido autofagia<sup>(32)</sup>. Todavia, diante dos resultados obtidos, resta evidente que a morte celular, em qualquer de suas formas, não ocorreu de forma significativa após a exposição das células de osteossarcoma canino ao EEA.

É importante ressaltar que, nesta pesquisa, utilizou-se o extrato etanólico do açafraão, que é constituído por vários compostos. Embora alguns componentes majoritários tenham seus mecanismos definidos, os demais produtos fitoquímicos presentes podem apresentar mecanismos desconhecidos, que podem exibir efeitos adversos ou toxicidade exponencial. Ademais, é prudente e razoável considerar que pode ocorrer entre os metabólitos do extrato a possibilidade de sinergismo, antagonismo ou ativação de rotas metabólicas que ativem genes com potencial de favorecer a progressão de neoplasias<sup>(33,34)</sup> ou apresentarem efeitos protetores às células tumorais.

Conquanto os efeitos farmacológicos e mecanismos de compostos isolados do açafraão sejam predominantemente relatados como benéficos, isso não deve determinar que o extrato seja seguro nas mesmas condições. Os presentes resultados comprovam esta afirmação, dado que o EEA causou proliferação em células cancerígenas, ainda que seja rico em curcumina, composto que, isoladamente, comprovou sua eficácia contra algumas linhagens de células de câncer pela via apoptótica STAT3. A curcumina também inibiu a proliferação de modo concentração-dependente em células de adenocarcinoma papilar de tireoide, após receberem tratamento de 0 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM e 80 µM por 24 horas.<sup>(35)</sup>

Com relação à possibilidade de o EEA haver apresentado efeito protetor para as células tumorais, é importante salientar que a quantidade de fenóis totais presentes no extrato foi calculada em 691,49 mg de EAG/100 g. Este grupo de pesquisa recentemente demonstrou, em células endoteliais de coronária humana, o efeito protetor do extrato etanólico da casca do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)<sup>(36)</sup>, cujo teor total de fenóis foi calculado em 696,91 mg de EAG/100 g, ou seja, muito similar ao do EEA utilizado no presente experimento. Ainda que a maior quantidade de fenóis no açafraão seja composto pelos curcuminóides, observam-se também compostos fenólicos de comprovado poder antioxidante, como o ácido caféico, o ácido cumárico e a quercitina<sup>(21)</sup>, todos presentes no extrato de pequi mencionados anteriormente.

Os dados obtidos por imunocitoquímica mostraram que a proteína p53 mutante foi marcada fortemente, especialmente no grupo tratado com 1000 µM. O mesmo aconteceu com o resultado da Ki-67. A técnica de imunocitoquímica automatizada permitiu avaliar a expressão das proteínas p53, Ki-67 e Bcl-2 por meio de contagem semiquantitativa e qualitativa, tendo

sido validada por Fedchenko & Reifenrath e replicada desde então por pesquisadores da área<sup>(27,37)</sup>. Enfatiza-se que os resultados da imunocitoquímica não tem objetivo de nova contagem do total de células, mas de determinar o escore para o percentual de células marcadas pelos respectivos anticorpos e inferir diferenças de expressão das proteínas estudadas entre os grupos experimentais. Dessa forma, o número de células não é fator limitante para essa análise, mas sim o percentual marcado positivamente e a intensidade da marcação.

Os resultados são sugestivos que houve participação da via de sinalização da proteína p53 mutada, marcada em todos os grupos experimentais, na proliferação celular mostrada nos resultados de MTT. A forma As mutações no gene TP53 resultam em uma proteína p53 estruturalmente alterada, que perde sua capacidade de reparar o DNA ou de induzir a morte da célula tumoral<sup>(38)</sup>. Sendo assim, a expressão da forma mutante da proteína p53 é um valioso marcador de proliferação e progressão tumoral, pois está virtualmente presente em todos os tipos de câncer<sup>(39)</sup>.

Os resultados da expressão de Ki-67 também reiteram o grau de malignidade das células D-17 utilizadas neste estudo. Esta proteína é um biomarcador de referência do potencial de malignidade celular em diferentes tipos de neoplasias, incluindo células de osteossarcoma canino<sup>(37)(40)</sup>. Neste diapasão, validado em trabalhos anteriores, que Ki-67 é manifesto em células malignas proliferativas, abordados nas pesquisas como marcador nuclear.<sup>(41,42)</sup>

Já os achados em relação à proteína Bcl-2 não estão em consonância com os anteriores, pois apesar do grupo tratado com 50 µM demonstrar uma quantidade maior de expressão da proteína Bcl-2, sua significância não foi confirmada em análises estatísticas, (Figura 3). É provável que sua expressão não tenha sido maior devido a mecanismos que ainda não estão elucidados, mas que pode ter relação com os constituintes presentes no extrato, que exercem efeitos protetores e antiapoptóticos para as células malignas em estudo. Bcl-2 é crucial na regulação da apoptose celular, pois codifica uma proteína que integra a membrana mitocondrial e inibe a morte celular por apoptose, além de ativar a proliferação celular<sup>(43,44)</sup>.

O desenlace deste estudo vai de encontro a resultados de pesquisas com delineamentos semelhantes, cujo objetivo foi avaliar a citotoxicidade de extratos de outras plantas sobre células de câncer, com avaliação da proliferação celular e expressão de oncogenes<sup>(37,40,45,46)</sup>. Diante disso, reafirma-se a necessidade de precauções quanto à utilização de plantas e seus derivados, uma vez que tais produtos têm sido amplamente difundido como fitoterápicos, dos quais se inferem popularmente eficácia e segurança de forma instantânea, pelo fato de serem orgânicos e nativos. Contudo, metabólitos de plantas podem provocar efeitos ainda desconhecidos, como

toxicidade subaguda e crônica, inclusive resultando em carcinogênese<sup>(34,47)</sup> ou proliferação de clones celulares atípicos já existentes, como aqui relatado.

O presente estudo é o primeiro a demonstrar as propriedades proliferativas do extrato do açafrão sobre células de osteossarcoma canino. Este resultado é impactante e estabelece perspectivas para que mais pesquisas com compostos naturais sejam realizadas, com o propósito de elucidar os mecanismos de ação e vias de transdução de sinal envolvidas, visando promover maior eficácia e segurança no uso de plantas e seus subprodutos com finalidade terapêutica, particularmente o açafrão de Mara Rosa - GO.

## Conclusão

Os resultados mostraram que o tratamento de células de osteossarcoma canino com extrato etanólico de açafrão resulta na proliferação *in vitro* de células de osteossarcoma canino D-17, bem como no aumento da expressão de proteínas com importante participação na oncogênese e malignidade tumoral. Por consequência, deve-se exercer extrema cautela e serem realizados mais estudos para compreender melhor os mecanismos da utilização do açafrão como tratamento em osteossarcoma, tanto na espécie canina quanto em humanos.

## Conflito de interesses

Os autores declaram não possuir conflitos de interesse.

## Contribuições do autor

**Conceituação:** NM Alves, VS Cruz, E Arnhold, LL Nepomuceno, NP Soares e EG Araújo. **Análise formal:** VS Cruz, LL Nepomuceno, D Graziani e E Arnhold. **Aquisição de financiamento:** EG Araújo. **Investigação:** NM Alves, VS Cruz, NP Soares, D Graziani, PAM Gonçalves, GHS Badan e AM Santos. **Metodologia:** NM Alves, VS Cruz, E Arnhold, LL Nepomuceno, NP Soares, D Graziani, PAM Gonçalves, GHS Badan e AM Santos. **Gerenciamento do projeto:** VS Cruz e EG Araújo. **Recursos:** EG Araújo. **Supervisão:** EG Araújo. **Validação:** VS Cruz e E Arnhold. **Redação (esboço original):** NM Alves. **Redação (revisão e edição):** NM Alves, VS Cruz, E Arnhold, GHS Badan e EG Araújo.

## Referências

- Salehi B, Ata A, Kumar NVA, Sharopov F, Ramírez-Alarcón K, Ruiz-Ortega A, Ayatollahi SA, Fokou PVT, Kobarfard F, Zakaria ZA, Iriti M, Taheri Y, Martorell M, Sureda A, Setzer WN, et al. Antidiabetic potential of medicinal plants and their active components. Vol. 9, Biomolecules. 2019.
- Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, Tundis R, Sharifi-Rad M, Loizzo MR, Oluwaseun Ademiluyi A, Sharifi-Rad R, Ayatollahi SA, Iriti M. Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. Vol. 22, Molecules. 2017.

- Cortelo PC, Demarque DP, Dusi RG, Albernaz LC, Braz-Filho R, Goncharova EI, Bokesch HR, Gustafson KR, Beutler JA, Espindola LS. A molecular networking strategy: High-throughput screening and chemical analysis of brazilian cerrado plant extracts against cancer cells. Cells. 2021;10(3):1–13. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells10030691>
- Teklehaymanot T. An ethnobotanical survey of medicinal and edible plants of Yalo Woreda in Afar regional state, Ethiopia. J Ethnobiol Ethnomed. 2017;13(1).
- Nakaziba R, Anyolitho MK, Amanya SB, Sesaaazi CD, Byarugaba F, Ogwal-Okeng J, Alele PE. Traditional medicinal vegetables in northern uganda: An ethnobotanical survey. Int J Food Sci. 2021;2021.
- Veeresham C. Natural products derived from plants as a source of drugs. Vol. 3, Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research. 2012. p. 200–1.
- Fatima I, Kanwal S, Mahmood T. Evaluation of biological potential of selected species of family Poaceae from Bahawalpur, Pakistan. BMC Complement Altern Med. 2018;18(1):1–13.
- Seepe HA, Nxumalo W, Amoo SO. Natural products from medicinal plants against phytopathogenic fusarium species: Current research endeavours, challenges and prospects. Molecules. 2021;26(21).
- Clemen-Pascual LM, Macahig RAS, Rojas NRL. Comparative toxicity, phytochemistry, and use of 53 Philippine medicinal plants. Toxicol Reports. 2022;9:22–35.
- Morlock GE, Heil J, Bardot V, Lenoir L, Cotte C, Dubourdeaux M. Effect-directed profiling of 17 different fortified plant extracts by high-performance thin-layer chromatography combined with six planar assays and high-resolution mass spectrometry. Molecules. 2021;26(5).
- Borges J, Saturnino K, Cruz V, Araújo E. Ação Antioxidante Da Curcumina (*Curcuma Longa L.*) Na Injúria De Isquemia E Reperfusão Tecidual. Enciclopédia Biosf. 2019;16(29):48–62.
- Girme A, Saste G, Pawar S, Ghule C, Mirgal A, Patel S, Tiwari A, Ghoshal S, Bharate SB, Bharate SS, Reddy DS, Vishwakarma RA, Hingorani L. Quantitative determination and characterization of a kashmir saffron (*Crocus sativus L.*)-based botanical supplement using single-laboratory validation study by HPLC-PDA with LC-MS/MS and HPTLC Investigations. ACS Omega. 2021;6(36):23460–74.
- Marchi JP, Tedesco L, Melo ADC, Frasson AC, França VF, Wietzikoski Sato S, Wietzikoski EC. *Curcuma longa L.*, o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. Arq Ciências da Saúde da UNIPAR. 2016;20(3).
- Lee SY, Cho SS, Li YC, Bae CS, Park KM, Park DH. Anti-inflammatory effect of *Curcuma longa* and *Allium hookeri* Co-treatment via NF- $\kappa$ B and COX-2 Pathways. Sci Rep. 2020;10(1):1–11.
- Nascimento PRS do, Silva Júnior EL da, Branco AC da SC. Aplicações farmacológicas da *Curcuma longa L.* como planta medicinal: Uma revisão. Res Soc Dev. 2020;9(10):e2629108430.
- Czernicka L, Grzegorzczak A, Marzec Z, Antosiewicz B, Malm A, Kukula-Koch W. Antimicrobial potential of single metabolites of *Curcuma longa* assessed in the total extract by thin-layer chromatography-based bioautography and image analysis. Int J Mol Sci. 2019;20(4).
- Chen C, Long L, Zhang F, Chen Q, Chen C, Yu X, Liu Q, Bao J, Long Z. Antifungal activity, main active components and



mechanism of *Curcuma longa* extract against *Fusarium graminearum*. PLoS One. 2018;13(3):1–19.

18. Soares NP, Nepomuceno LL, Cruz V de S, Arnhold E, Vieira V de S, Borges JC de A, Pereira DKS, Pereira KF, Araújo EG de. Curcumin promotes extrinsic apoptosis in canine osteosarcoma cells. Res Soc Dev. 2020;9(10):e7289109231. Available from: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.9231>

19. Comblain F, Serisier S, Barthelemy N, Balligand M, Hentrotin Y. Review of dietary supplements for the management of osteoarthritis in dogs in studies from 2004 to 2014. J Vet Pharmacol Ther. 2016;39(1):1–15.

20. Mathieu S, Soubrier M, Peirs C, Monfoulet LE, Boirie Y, Tournadre A. A Meta-Analysis of the Impact of Nutritional Supplementation on Osteoarthritis Symptoms. Nutrients. 2022;14(8):1–21.

21. Sabir SM, Zeb A, Mahmood M, Abbas SR, Ahmad Z, Iqbal N. Phytochemical analysis and biological activities of ethanolic extract of *Curcuma longa* rhizome. Brazilian J Biol. 2021;81(3):737–40.

22. Poon AC, Matsuyama A, Mutsaers AJ. Recent and current clinical trials in canine appendicular osteosarcoma. Can Vet J. 2020;61(3):301–8.

23. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. Vol. 14, Nature Reviews Cancer. 2014. p. 359–70.

24. Teles JC de AB, Soares NP, Graziani D, Júnior ER de O, Lima EM, Nepomuceno LL, Vieira V de S, Cruz V de S, Saturnino KC, Arnhold E, Eugênio Gonçalves de Araújo. Curcumin rich extract from central brazil *Curcuma longa* protects human umbilical vein endothelial cells under oxidative stress. ABCS Heal Sci. 2022;In Press(MS 2021-005):1–10.

25. Péret-Almeida L, da Cunha Naghetini C, de Aguiar Nunan E, Junqueira RG, Beatriz Abreu Glória M. In vitro antimicrobial activity of the ground rhizome, curcuminoid pigments and essential oil of *Curcuma longa* L. Cienc e Agrotecnologia. 2008;32(3):875–81.

26. Nepomuceno LL, Carvalho LS de, Soares NP, Cruz V de S, Arnhold E, Ferreira JL, Araújo EG de. Padronização Metodológica in Vitro Do Ensaio Colorimétrico Mtt Para Avaliação Da Atividade De Formazan E Dosagem Do Fármaco: Padronização Do Teste Colorimétrico Mtt. In: Samylla MCS, editor. Farmacologia Aplicada à Enfermagem: Aspectos Teóricos e Práticos. 1st ed. 2021. p. 149–61. Available from: <https://doi.org/10.37885/201202541>

27. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. Vol. 9, Diagnostic pathology. 2014. p. 221.

28. Soleimani V, Sahebkar A, Hosseinzadeh H. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. Phytther Res. 2018;32(6):985–95.

29. Giannoulaki P, Kotzakioulafi E, Chourdakis M, Hatzitolios A, Didangelos T. Impact of *Crocus sativus* L. on metabolic profile in patients with diabetes mellitus or metabolic syndrome: A systematic review. Nutrients. 2020;12(5):1–17.

30. Vahdati Hassani F, Naseri V, Razavi BM, Mehri S, Abnous K, Hosseinzadeh H. Antidepressant effects of crocin and its effects on transcript and protein levels of CREB, BDNF, and VGF in rat hippocampus. DARU, J Pharm Sci. 2014;22(1):1–9.

31. Mortezaee K, Salehi E, Mirtavoos-mahyari H, Motevaseli E, Najafi M, Farhood B, Rosengren RJ, Sahebkar A. Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for

cancer therapy. J Cell Physiol. 2019;234(8):12537–50.

32. Zhang Y, Chen P, Hong H, Wang L, Zhou Y, Lang Y. JNK pathway mediates curcumin-induced apoptosis and autophagy in osteosarcoma MG63 cells. Exp Ther Med. 2017;14(1):593–9.

33. Akhtar MF, Saleem A, Sharif A, Akhtar B, Nasim M Bin, Peerzada S, Raza M, Ijaz H, Ahmed S, Shabbir M, Ali S, Akbar Z, Ul Hassan SS. Genotoxic and cytotoxic action potential of terminalia citrina, a medicinal plant of ethnopharmacological significance. EXCLI J. 2016;15:589–98.

34. Amarasiri SS, Attanayake AP, Arawwawala LDAM, Jayatilaka KAPW, Mudduwa LKB. Acute and 28-day repeated-dose oral toxicity assessment of abelmoschus moschatus medik. in healthy wistar rats. Evidence-based Complement Altern Med. 2020;2020.

35. Khan AQ, Ahmed EI, Elareer N, Fathima H, Prabhu KS, Siveen KS, Kulinski M, Azizi F, Dermime S, Ahmad A, Steinhoff M, Uddin S. Curcumin-mediated apoptotic cell death in papillary thyroid cancer and cancer stem-like cells through targeting of the JAK/STAT3 signaling pathway. Int J Mol Sci. 2020;21(2).

36. Braga KMS, Araujo EG, Sellke FW, Abid MR. Pequi fruit extract increases antioxidant enzymes and reduces oxidants in human coronary artery endothelial cells. antioxidants. 2022;11(3):474. Available from: <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11030474>

37. Nepomuceno LL, Soares NP, Borges JC de A, Vieira V de S, Pereira DKS, Pereira KF, Cruz V de S, Ferreira JL, Arnhold E, Araújo EG de. Extrato etanólico da casca de fruta de *Caryocar brasiliense* promove a morte e o controle do ciclo celular em células osteossarcoma caninas. Res Soc Dev. 2020;9(10):e7299109194.

38. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. Nature. 2013;502(7471):333–9.

39. Sabapathy K, Lane DP. Understanding p53 functions through p53 antibodies. Vol. 11, Journal of Molecular Cell Biology. 2019. p. 317–29.

40. Vieira VS, Cruz VS, Nepomuceno LL, Soares NP, Arnhold E, Teixeira WFP, Vieira DS, Borges JCA, Paixão FM, Araújo EG, Vieira VS. Crude extract of Jatobá leaves promotes canine osteosarcoma cell D17 proliferation. Vet World. 2022;15(5):1283–9.

41. Wang Y xing, Wang Y yuan, Yang C gang, Bu H, Yang W tao, Wang L, Xu W mang, Zhao X long, Zhao W xing, Li L, Song S ling, Yang J lun. An interobserver reproducibility analysis of size-set semiautomatic counting for Ki67 assessment in breast cancer. Breast. 2020;49:225–32.

42. Robertson S, Acs B, Lippert M, Hartman J. Prognostic potential of automated Ki67 evaluation in breast cancer: different hot spot definitions versus true global score. Breast Cancer Res Treat. 2020;183(1):161–75.

43. Jong Kyong KIM, Alan Diehl J. Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. Vol. 220, Journal of Cellular Physiology. 2009. p. 292–6.

44. Adams JM, Cory S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. Cell Death Differ. 2018;25(1):27–36.

45. Kowalczyk T, Sitarek P, Skala E, Toma M, Wielanek M, Pytel D, Wiczfińska J, Szemraj J, Śliwiński T. Induction of apoptosis by in vitro and in vivo plant extracts derived from

*Menyanthes trifoliata* L. in human cancer cells. Cytotechnology. 2019;71(1):165–80.

46. Mbaveng AT, Kuete V, Efferth T. Potential of central, Eastern and Western Africa medicinal plants for cancer therapy: Spotlight on resistant cells and molecular targets. Vol. 8, Fron-

tiers in Pharmacology. 2017.

47. Chahardehi AM, Arsad H, Lim V. Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. Vol. 9, Plants. 2020. p. 1–35.