UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimioterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores *in vitro* e *in vivo*, e identificação de alterações na expressão do gene *Tp53*

Leonardo Meneghin Mendonça

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimioterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores *in vitro* e *in vivo*, e identificação de alterações na expressão do gene *Tp53*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Leonardo Meneghin Mendonça

Orientadora: Prof^a Dr^a Lusânia Maria Gregg Antunes

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Toxicologia em 30/11/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Mendonça, Leonardo Meneghin

Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimioterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores *in vitro* e *in vivo*, e identificação de alterações na expressão do gene *Tp53*. Ribeirão Preto, 2012.

110 p. : il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Antunes, Lusânia Maria Gregg.

1. Neurotoxicidade. 2. Antigenotoxicidade. 3. Biodisponibilidade. 4. Antioxidantes. 5. Expressão gênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leonardo Meneghin Mendonça

Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimioterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores *in vitro* e *in vivo*, e identificação de alterações na expressão do gene *Tp53*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lusânia Maria Gregg Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico...

...à minha querida e amada família, pessoas que acreditaram em mim incondicionalmente, me incentivaram, apoiaram e deram força em todos os momentos, minha mãe Beatriz (in memoriam), meu pai José Mendonça, meus irmãos Cláudio e Márcia, meus cunhados Ana e Dário e meus sobrinhos Maria Clara e Gustavo. A todos vocês eu dedico esta realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Deus, que ilumina os meus caminhos e me tornou apto a conduzir e concluir este trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes, por ter me concedido a oportunidade de desenvolver essa pesquisa sob sua orientação. Obrigado por todo o seu empenho e dedicação, aconselhando e direcionando o desenvolvimento deste projeto, contribuindo de maneira determinante para a qualidade deste trabalho. Obrigado por todo seu apoio, incentivo e compreensão, tão importantes na minha formação acadêmica e pessoal. Obrigado também pela ótima convivência e pelos momentos agradáveis durante este longo caminho percorrido. Muito obrigado!

À Profa. Dra. Maria Cristina Paiva Araújo (in memoriam) da UFPE, pela significativa contribuição nos estudos de mutagênese com a curcumina, iniciados no Departamento de Genética da FMRP-USP.

Ao laboratório de Toxicologia da FCFRP-USP, pela disponibilidade em realizar a fase analítica da quantificação da curcumina em plasma. Obrigado ao Mateus Machado Bergamaschi e à Sônia Aparecida Carvalho Dreossi, pela importante contribuição realizando as análises cromatográficas.

Ao Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas do laboratório de Física Industrial da FCFRP-USP, e a Profa. Dra. Cristiane Cardoso Correia Teixeira pela doação da curcumina hidrossolúvel.

Em especial, agradeço à Carla da Silva Machado a minha querida amiga e companheira, pela parceria nos trabalhos acadêmicos, pelas infindáveis discussões científicas e por estar sempre presente, compartilhado comigo tantos momentos bons.

À Joana D`arc Castania Darin, Regislaine Valéria Burim e Jefferson Leandro Codognotto pelo apoio técnico e especialista concedidos, e pelo imprescindível auxílio na realização dos experimentos.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo excelente atendimento e disposição na resolução das dificuldades que surgiram ao longo do caminho.

Aos meus professores da graduação em Farmácia-Bioquímica da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, pela ótima formação acadêmica, e pelo grande incentivo em ingressar na pós-graduação em Toxicologia.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, pela estrutura disponibilizada para a realização do projeto, e em especial o corpo docente do Programa de Pós-graduação em Toxicologia, pelo excelente trabalho realizado, e pela contribuição no desenvolvimento da área de Toxicologia.

Aos amigos graduandos, pós-graduandos e ex-alunos do laboratório de Nutrigenômica: Alexandre Ferro Aissa, Cátia Lira do Amaral, Estela Beatriz Behling, Eliziani Mieko Konta, Farah Maria Drumond Chequer, Graciela Cristina dos Santos, Juliana Mara Serpeloni, Lívia Cristina Hernandez, Maíra Prado, Mara Ribeiro de Almeida, Marina Hernandez da Silva, Marina Prearo Pizetta, Paula Lumy Takeuchi, Rafaela de Barros e Lima Bueno, Rita de Cássia Silva Oliveira, Tarsila Daysy Ursula Hermogenes Gomes e Vinícius de Paula Venâncio pelas enriquecedoras discussões científicas, auxílio na realização dos experimentos e convivência ao longo dos anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Doutorado e auxílio técnico que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido para a realização do projeto.

RESUMO

MENDONÇA, L. M. **Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimioterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores *in vitro* e *in vivo*, e identificação de alterações na expressão do gene *Tp53***. 2012. 110f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A curcumina é um pigmento amarelo encontrado no rizoma da planta *Curcuma longa* Linn. que possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticâncer. Embora tenha um grande potencial terapêutico, sua aplicação clínica é limitada pelas baixas concentrações plasmáticas obtidas após administração oral. A cisplatina é um agente quimioterápico utilizado no tratamento de vários tipos de cânceres, entretanto é inerente o desenvolvimento de sérios efeitos adversos. Seu principal mecanismo de ação em células tumorais envolve a interação direta com o DNA e formação de *crosslinks*, levando a célula a parada do ciclo celular e apoptose pela ativação da proteína p53. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor da curcumina hidrossolúvel formulada na dispersão sólida curcumina/gelucire®50-13/aerosil® (curcumina DS) sobre a citotoxicidade, neurotoxicidade e genotoxicidade da cisplatina *in vitro* e *in vivo*, além da sua possível interferência na eficácia antitumoral da cisplatina *in vitro*. Os estudos *in vitro* foram realizados no modelo de neurotoxicidade em células PC12 e em células tumorais HepG2, derivadas de um hepatocarcinoma humano. Os experimentos *in vivo* foram realizados em ratos Wistar, comparando a absorção gastrointestinal e os efeitos da curcumina DS e da curcumina padrão. Nos estudos *in vitro* a curcumina DS reduziu a neurotoxicidade da cisplatina no ensaio de crescimento de neuritos. A expressão do gene *Tp53* nas células PC12 não foi modulada pela curcumina DS. Na linhagem celular tumoral HepG2, a curcumina DS não reduziu a citotoxicidade da cisplatina. Os resultados dos experimentos *in vivo* mostraram que curcumina DS e a curcumina padrão reduziram significativamente a formação de micronúcleos induzidos pela cisplatina na medula óssea, porém, no ensaio do cometa, não alteraram a formação de *crosslinks* induzidos pela cisplatina no tecido renal. A curcumina DS e a curcumina padrão não modularam o estresse oxidativo e a expressão do gene *Tp53* no tecido renal. Nossos resultados sugerem que a curcumina não interfere na atividade antitumoral da cisplatina, uma vez que a curcumina não reduziu a citotoxicidade da cisplatina nas células HepG2, e nem a expressão do gene *Tp53* nas células PC12 e no tecido renal. Além disso, os resultados obtidos no ensaio do cometa mostraram que a curcumina não reduziu a formação de *crosslinks* platina-DNA, o principal mecanismo de citotoxicidade da cisplatina. A formulação da curcumina em dispersão sólida aumentou significativamente a sua biodisponibilidade, além de não apresentar redução dos efeitos antimutagênicos em relação à curcumina padrão. Os efeitos protetores da curcumina DS, como a redução da neurotoxicidade e mutagenicidade induzida pela cisplatina, poderia trazer benefícios à quimioterapia, possibilitando uma terapia mais eficaz e melhor qualidade de vida aos pacientes. Os resultados sugerem que os efeitos protetores da curcumina poderiam ser seletivos às células saudáveis, não reduzindo os efeitos da cisplatina em células tumorais.

Palavras-chave: Neurotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade, antioxidantes, expressão gênica.

ABSTRACT

MENDONÇA, L. M. **Evaluation of a water-soluble curcumin formulation against toxicity induced by antineoplastic drug cisplatin: the possible protective effects *in vitro* and *in vivo*, and modulation of *Tp53* gene expression.** 2012. 110f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Curcumin is a yellow pigment derived from the rhizome of *Curcuma longa* Linn. Its pharmacological effects include antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. Although curcumin possesses great therapeutic potential, its low oral bioavailability limits therapeutic application. Cisplatin is a chemotherapeutic drug with activity against a wide variety of tumors; however, it has notorious side effects. Its main mechanism of action in tumor cells involves direct interaction with DNA and formation of crosslinks, leading the cells to a cycle arrest and apoptosis through activation of p53. This study's aim was to evaluate the protective effects of water-soluble curcumin, which was formulated in a solid dispersion consisting of curcumin/gelucire®50-13/aerosil® (curcumin DS), on the cytotoxicity, neurotoxicity, and genotoxicity of cisplatin *in vitro* and *in vivo* beyond its possible interference in the antitumor efficacy of cisplatin *in vitro*. *In vitro* studies were performed on the model of neurotoxicity in PC12 cells and in HepG2 tumor cells derived from a human hepatocarcinoma. The *in vivo* experiments were performed on Wistar rats, comparing gastrointestinal absorption and the effects of curcumin DS and standard curcumin. In the *in vitro* studies, curcumin DS reduced neurotoxicity of cisplatin in the neurite outgrowth assay. *Tp53* gene expression in PC12 cells was not modulated by curcumin DS. In the tumor cell line HepG2, curcumin DS did not reduce the cytotoxicity of cisplatin. Results of *in vivo* experiments showed that curcumin DS and standard curcumin significantly reduced micronucleus formation induced by cisplatin in bone marrow. However, on the comet assay, it did not affect the formation of crosslinks induced by cisplatin on renal tissue. Curcumin DS and standard curcumin did not modulate oxidative stress or the expression of the *Tp53* gene in renal tissue. Our results suggest that curcumin DS does not compromise the antitumor activity of cisplatin, since curcumin did not reduced the cytotoxicity of cisplatin in HepG2 cells nor *Tp53* gene expression in PC12 cells or in renal tissue. Furthermore, the results of the comet assay suggest that curcumin did not reduce the formation of platinum-DNA crosslinks, the major mechanism of cisplatin cytotoxicity. The formulation of curcumin in solid dispersion significantly increased its bioavailability and did not reduced its antimutagenic effect compared to standard curcumin. The protective effects of curcumin DS, such as reducing neurotoxicity and mutagenicity induced by cisplatin, could provide benefits to chemotherapy, including more effective therapy and improved quality of life. The findings suggest that the protective effects of curcumin could be selective to healthy cells without compromising the effects of cisplatin in tumor cells.

Keywords: Neurotoxicity, genotoxicity, antigenotoxicity, antioxidants, gene expression

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pó do rizoma da cúrcuma.	2
Figura 2. Estrutura química da curcumina (WANG et al., 2011).....	3
Figura 3. Estrutura química da cisplatina (SIDDIK, 2003).	9
Figura 4. Ilustração simplificada da hidrólise da cisplatina e sua interação com o DNA (WHITTAKER et al., 1998).....	10
Figura 5. Fotomicrografia de células PC12 (a) indiferenciadas e (b) diferenciadas após 96 horas de exposição ao <i>nerve growth factor</i> , na concentração de 50 ng/mL. Aumento original 400X.	21
Figura 6. Protocolo experimental para a avaliação da viabilidade celular em células HepG2, e em células PC12 indiferenciadas e diferenciadas no ensaio do MTT.....	23
Figura 7. Ilustração do inserto de cultura celular contendo células PC12 para o ensaio de crescimento de neuritos. NGF: <i>nerve growth factor</i>	24
Figura 8. Protocolo experimental para o ensaio de crescimento de neuritos. GLA: mistura gelucire®50-13/aerosil®; CMN: curcumina; cDDP: cisplatina.	25
Figura 9. Especificidade das reações de RT-qPCR evidenciada pela curva de <i>melting</i> para (a) o gene-alvo <i>Tp53</i> e (b) o gene de referência <i>Actb</i>	27
Figura 10. Protocolo experimental para o ensaio de expressão do gene <i>Tp53</i> em células PC12.	27
Figura 11. Protocolo experimental para avaliação do efeito do pré-tratamento com curcumina DS e padrão na genotoxicidade, estresse oxidativo e modulação da expressão do gene <i>Tp53</i> em ratos Wistar. CN: controle negativo, GLA: mistura gelucire®50-13/aerosil®, CMN: curcumina, DS: dispersão sólida, cDDP: cisplatina. .	30
Figura 12. Fotomicrografia obtida no teste do micronúcleo em células da medula óssea de ratos Wistar. Coloração Giemsa e aumento original de 1000X. (a) Eritrócito	

policromático (PCE), (b) Eritrócito normocromático (NCE), (c) Eritrócito policromático micronucleado (MNPCE).....32

Figura 13. Imagens da análise de nucleoides com o software CometAssay IV. (A) Nucleoide sem dano ao DNA. (B) Nucleoide com alto grau de dano ao DNA.....33

Figura 14. (A) Efeito da curcumina DS (CMN DS), nas concentrações 1,0 ou 10 µg/mL, no crescimento de neuritos em células PC12 estimuladas pelo *nerve growth factor*. (B) Efeito da curcumina DS (1,0 ou 10 µg/mL) na redução do crescimento de neuritos induzida pela cisplatina (cDDP) na concentração de 10 µg/mL em células PC12 estimuladas pelo NGF. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *Estatisticamente diferente do controle negativo. #Estatisticamente diferente do grupo cisplatina. Teste *t* ($p < 0,05$).....39

Figura 15. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para verificação da integridade das amostras de RNA. As bandas predominantes no gel correspondem ao RNA ribossomal 28S e o RNA ribossomal 18S. 1: Controle negativo; 2 Curcumina DS 5,0 µg/mL; 3: cDDP 0,1 µg/mL; 4: Curcumina DS 5,0 µg/mL + cDDP 0,1 µg/mL. Gel visualizado e fotografado em fotodocumentador UV.40

Figura 16. Expressão gênica relativa do *Tp53* em células PC12 após tratamento com a curcumina DS 5,0 µg/mL (CMN DS), cisplatina 0,1 µg/mL (cDDP) e suas associações por 48 horas. CN: controle negativo. O gene *Actb* foi utilizado como referência. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *Estatisticamente diferente do controle negativo. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).....41

Figura 17. Avaliação da citotoxicidade da cisplatina (cDDP) e curcumina DS (CMN DS) em células HepG2 pelo método MTT. (A) As células foram tratadas com cisplatina nas concentrações de 0,1; 1,0 ou 10 µg/mL por 24 horas. (B) As células foram tratadas com a curcumina DS nas concentrações de 0,1; 1,0 ou 10 µg/mL por 24 horas. CN: controle negativo. GLA: gelucire®50-13/aerosil®. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *Estatisticamente diferente do controle negativo. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).....42

Figura 18. Avaliação do efeito da curcumina DS (CMN DS) na citotoxicidade da cisplatina (cDDP) em células HepG2 pelo método MTT. As células foram tratadas com cisplatina na concentração de 10 µg/mL associada ou não com a curcumina DS nas concentrações de 0,1; 1,0 ou 10 µg/mL por 24 horas. CN: controle negativo. GLA: gelucire®50-13/aerosil®. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *Estatisticamente diferente do controle negativo. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).....43

Figura 19. Cromatogramas da extração da curcumina por precipitação de proteínas e quantificação por CLAE/UV em plasma de ratos Wistar. (A) Extração de curcumina e padrão interno de água. (B). Plasma branco (C) Extração da curcumina e padrão interno do plasma de ratos Wistar. A letra “a” indica o pico do padrão interno e a letra “b” indica o pico da curcumina.....44

Figura 20. Concentração plasmática de curcumina versus tempo após administração oral por gavagem de 500 mg/kg m.c. de curcumina padrão ou curcumina DS em ratos Wistar. Valores representam a média ± desvio padrão para cada tratamento (seis animais/tratamento). *Diferença estatística entre curcumina DS e curcumina padrão, no mesmo tempo após a administração. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).....45

Figura 21. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) na medula óssea de ratos Wistar. CN: controle negativo. GLA: gelucire®50-13/aerosil®. CMN: curcumina. DS: dispersão sólida. cDDP: cisplatina. Valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo (seis animais/grupo). *Estatisticamente diferente do controle negativo. #Estatisticamente diferente do grupo cisplatina. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Viabilidade de células PC12 indiferenciadas (PC12) e diferenciadas (dPC12) tratadas com curcumina DS, cisplatina ou a sua associação por 24 horas, determinadas pelo ensaio do MTT	38
Tabela 2 - Parâmetros farmacocinéticos da curcumina DS e curcumina padrão após administração oral em ratos Wistar	46
Tabela 3 - Variação na massa corpórea dos ratos Wistar durante o período experimental e porcentagem de massa do rim em relação à massa corpórea	47
Tabela 4 - Relação (%) entre eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos totais (PCE+NCE) na medula óssea de ratos Wistar após eutanásia	48
Tabela 5 - Porcentagem de DNA na cauda de nucleoides obtidos no ensaio do cometa em células do rim e do sangue periférico	51
Tabela 6 - Avaliação do estresse oxidativo em rim de ratos Wistar tratados com curcumina, cisplatina ou suas associações.....	52
Tabela 7 - Expressão gênica relativa do <i>Tp53</i> no rim de ratos Wistar tratados com a curcumina, cisplatina e suas associações.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Actb</i>	Beta actina
%DNA	Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides
AP-1	Fator ativador de proteína 1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia-mutated</i>
ATR	<i>Rad3-related</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
cDDP	Cisplatina
CDK	Cinases dependentes de ciclina
cDNA	DNA complementar sintetizado pela enzima transcriptase reversa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMN	Curcumina
COX-2	Ciclooxigenase-2
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
dPC12	Células PC12 diferenciadas após exposição ao NGF
DS	Dispersão sólida
DTNB	5,5 '-dithio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>GADD45</i>	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible</i>
<i>Gapdh</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GLA	Mistura de gelucire®50-13/aerosil®

GSH	Glutathiona
HEK 293	Linhagem de células embrionárias humanas derivadas de rim
HeLa	Linhagem celular de carcinoma cervical
Hep3B	Linhagem celular de hepatocarcinoma
HepG2	Linhagem celular de hepatocarcinoma
<i>Hkl</i>	Hexoquinase tipo I
JAK-STAT	<i>Janus Kinase - signal transducer and activator of transcription</i>
jnk	c-Jun N-terminal quinase
MCF-7	Linhagem celular tumoral de câncer de mama
MNPCE	Eritrócito policromático micronucleado
MPTP	1-metil-1-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirimidina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NCE	Eritrócito normocromático
NF-κB	Fator nuclear κB
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
p53	Proteína p53
PC12	Linhagem celular de feocromocitoma de rato
PCE	Eritrócito policromático
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
RT-qPCR	Reação da transcriptase reversa seguida da PCR quantitativa
SK-N-SH	Linhagem celular de neuroblastoma
STATs	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
SW620	Linhagem celular de câncer de colon
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<i>Tp53</i>	Nomenclatura oficial do gene supressor tumoral para ratos
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
ΔCt	Diferença entre o Ct do grupo tratado e o Ct do grupo não tratado
ΔΔCt	Relação entre o ΔCt do gene alvo e o ΔCt do gene de referência

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas	vii
 1 INTRODUÇÃO	 1
1.1 Curcumina	1
1.2 Efeitos neuroprotetores da curcumina	4
1.3 Efeitos anticâncer da curcumina	6
1.4 Cisplatina	9
1.4.1 Toxicidade da cisplatina	10
1.5 Modelos <i>in vitro</i> de estudo de neurotoxicidade	14
1.6 Antioxidantes na quimioterapia	15
 2 OBJETIVOS	 18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
 3 MATERIAL E MÉTODOS	 20
3.1 Material	20
3.1.1 Agentes químicos	20
3.2 Métodos utilizados nos ensaios <i>in vitro</i>	20
3.2.1 Linhagens celulares	20
3.2.2 Delineamento dos experimentos <i>in vitro</i>	22
3.2.3 Avaliação da viabilidade celular	22
3.2.3.1 Protocolo experimental	23
3.2.4 Ensaio de crescimento de neuritos	23
3.2.4.1 Protocolo experimental	24
3.2.5 Análise da expressão do gene <i>Tp53</i> em células PC12	25
3.2.5.1 Protocolo experimental	27
3.3 Métodos utilizados nos ensaios <i>in vivo</i>	28

3.3.1	Animais	28
3.3.2	Delineamento experimental.....	28
3.3.3	Quantificação de curcumina no plasma por CLAE	30
3.3.4	Teste do micronúcleo em células da medula óssea.....	31
3.3.5	Ensaio do cometa em células do sangue periférico e do rim	32
3.3.6	Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e GSH tecidual.....	34
3.3.7	Análise da expressão do gene <i>Tp53</i> em células do rim.....	34
3.4	Análise estatística	35
4	RESULTADOS.....	37
4.1	Resultado dos experimentos <i>in vitro</i>	37
4.1.1	Avaliação do efeito citoprotetor da curcumina em células PC12.....	37
4.1.2	Ensaio de crescimento de neuritos	38
4.1.3	Análise da expressão do gene <i>Tp53</i> em células PC12.....	40
4.1.4	Efeito da curcumina na citotoxicidade da cisplatina em células HepG2.....	42
4.2	Resultados dos experimentos <i>in vivo</i>	44
4.2.1	Determinação das concentrações plasmáticas de curcumina.....	44
4.2.2	Variação de massa corpórea e massa relativa do rim	46
4.2.3	Antigenotoxicidade da curcumina	48
4.2.4	Avaliação do estresse oxidativo	51
4.2.5	Análise da expressão do gene <i>Tp53</i> em células do rim.....	52
5	DISCUSSÃO	55
5.1	Experimentos <i>in vitro</i>	56
5.2	Experimentos <i>in vivo</i>	60
6	CONCLUSÕES.....	70
7	REFERÊNCIAS.....	72
8	ANEXOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
8.1	Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais	Erro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Curcumina

O uso de plantas para finalidades terapêuticas remete às mais antigas civilizações. Durante a sua evolução, o homem aprofundou seus conhecimentos sobre as propriedades terapêuticas das plantas de maneira empírica, melhorando a sua utilização na prevenção e cura de doenças e seus sintomas. Embora a utilização de plantas no tratamento e cura de enfermidades seja amplamente difundida, muitas vezes os constituintes químicos responsáveis pelos efeitos biológicos não são conhecidos (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Entretanto, o desenvolvimento científico e tecnológico permitiu o surgimento de metodologias para os estudos de caracterização fitoquímica de plantas medicinais, e a identificação dos compostos bioativos responsáveis pelos efeitos farmacológicos. Assim, plantas com reconhecidas propriedades medicinais como a *Curcuma longa* Linn. puderam ter seus compostos bioativos identificados (KINGHORN, 2001).

A *Curcuma longa* Linn. tem sido amplamente utilizada na medicina ayurvédica e chinesa. De acordo com a medicina tradicional indiana, ela pode ser utilizada no tratamento de desordens biliares, anorexia, coriza, diabetes, doenças hepáticas, reumatismo e sinusite. É uma planta do tipo herbácea e perene, encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo originária do sudeste da Ásia, e cultivada extensamente na Índia e China. Seu cultivo introduzido em algumas regiões do Brasil, e é conhecida popularmente como cúrcuma, açafrão da Índia, açafrão ou gengibre dourado (FILHO et al., 2000; SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005).

O rizoma é a parte da cúrcuma de maior interesse, sendo frequentemente utilizado na forma de pó, obtido da moagem dos rizomas secos (Figura 1). O pó do rizoma da cúrcuma também é utilizado em alimentos como corante e aromatizante, e é um dos principais componentes na formulação do *curry* (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). A cúrcuma contém uma variedade de curcumoides e muitos dos seus efeitos biológicos e terapêuticos são atribuídos, principalmente, à presença da curcumina (ARAÚJO; LEON, 2001; MAHESHWARI et al., 2006).

A curcumina é um pigmento amarelo encontrado no rizoma da planta. Seus efeitos biológicos têm sido extensamente estudados, demonstrando principalmente

ação antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer. Entretanto, vários outros efeitos biológicos e aplicações terapêuticas têm sido explorados, entre eles, efeitos antiprotozoários, antimicrobianos, antivirais, e sua aplicação em doenças cardiovasculares, diabetes e em doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009; GUPTA et al., 2012).

Fonte: Leonardo Meneghin Mendonça

Figura 1. Pó do rizoma da cúrcuma.

A curcumina é um dos principais constituintes da cúrcuma, presente em aproximadamente 5% nos rizomas das plantas cultivadas no Brasil (FILHO et al., 2000). É um polifenólico lipossolúvel, estruturalmente composto de dois anéis metoxifenol unidos por estrutura β -dicetona, como pode ser observado na Figura 2. Os grupos fenólicos e a β -dicetona são estruturas características de compostos antioxidantes, sendo fundamentais para a ação antioxidante da curcumina (ARAUJO; LEON, 2001; SINGH et al., 2011; XIAO et al., 2010).

Estudos mostram que a curcumina tem a capacidade de inibir a peroxidação lipídica em diferentes tecidos, e que tem uma capacidade antioxidante semelhante a do α -tocoferol. A curcumina é capaz de regular as concentrações intracelulares das enzimas antioxidantes como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase, e de agir no sequestro de espécies reativas como o radical superóxido e o radical hidroxila. Entretanto, assim como outros antioxidantes naturais, ela também pode agir como pró-oxidante em algumas condições dependentes da concentração

e do ambiente químico, como a disponibilidade de Cu^{2+} e outros metais de transição (DECKER, 1997; REDDY; LOKESH, 1992; SOOBRATTEE et al., 2005; SREEJAYAN; RAO, 1994).

Figura 2. Estrutura química da curcumina (WANG et al., 2011).

Além das atividades farmacológicas decorrentes das propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, foram identificados efeitos da curcumina em diversos alvos moleculares. Efeitos celulares da curcumina incluem a parada do ciclo e inibição da proliferação celular, indução de apoptose e modulação da expressão gênica. Seus principais alvos moleculares incluem o fator nuclear κB (NF- κB), a c-Jun N-terminal quinase (jnk), a ciclooxigenase-2 (COX-2), a proteína quinase C, a glutationa-S-transferase e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (ZHOU; BEEVERS; HUANG, 2011).

Embora a curcumina tenha um grande potencial terapêutico, sua aplicação clínica é limitada pelas baixas concentrações plasmáticas obtidas após administração oral. A baixa biodisponibilidade oral da curcumina foi demonstrada primeiramente por Wahlstrom e Blennow (1978) e atribuída a uma baixa absorção no trato gastrointestinal, rápida biotransformação e uma rápida eliminação sistêmica. Após a administração oral, a curcumina é biotransformada no intestino e no fígado, sendo reduzida ou formando conjugados glicuronados ou sulfatados, que não possuem atividade farmacológica (SHARMA; STEWARD; GESCHER, 2007).

Uma maior biodisponibilidade aumentaria o potencial de aplicação terapêutica da curcumina, uma vez que concentrações adequadas para exercer seus efeitos farmacodinâmicos alcançariam os tecidos alvos. A natureza lipofílica da curcumina, e conseqüentemente sua pequena solubilidade em soluções aquosas, é considerado um fator importante para sua baixa biodisponibilidade após administração oral, uma vez que a solubilidade no conteúdo do trato gastrointestinal é fundamental para sua

absorção quando administrada por via oral (DANNENFELSER et al., 2004; SHARMA; STEWARD; GESCHER, 2007).

Muitos estudos têm avaliado alternativas para aumentar a biodisponibilidade da curcumina. Estes estudos envolvem a síntese de análogos, a utilização conjunta com inibidores do metabolismo da curcumina, como a piperina, ou o desenvolvimento de novas formulações como as nanopartículas, micelas, complexos fosfolipídicos e as dispersões sólidas (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009; LI; BRAITEH; KURZROCK, 2005).

No presente estudo utilizamos a curcumina formulada em uma dispersão sólida ternária composta de curcumina/gelucire®50-13/aerosil® (curcumina DS) desenvolvida no Laboratório de Física Industrial da FCFRP-USP. A dispersão sólida de fármacos em carreadores é uma estratégia importante para melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, que frequentemente apresentam baixa biodisponibilidade oral. Esta tecnologia é caracterizada pela mistura de um ou mais compostos farmacologicamente ativos em um carreador, com o objetivo de alterar suas propriedades físico-químicas, como a estabilidade, solubilidade e taxa de dissolução, o que pode resultar em uma maior biodisponibilidade (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

1.2 Efeitos neuroprotetores da curcumina

Vários compostos antioxidantes encontrados em produtos naturais têm demonstrado atividade neuroprotetora, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em modelos de morte celular e neurodegeneração. A capacidade antioxidante intrínseca desses compostos, demonstrada pela capacidade de sequestro de radicais livres ou modulação dos sistemas antioxidantes endógenos, sugere que eles podem ser úteis na redução do estresse oxidativo neuronal. Os efeitos neuroprotetores de muitos desses compostos têm sido atribuídos, além da ação no estresse oxidativo, a mecanismos alternativos, como a modulação das cascatas de transdução dos sinais de apoptose e sobrevivência celular, ou efeitos na expressão gênica. Os vários mecanismos de ação dos antioxidantes naturais conferem a esses compostos grande potencial na prevenção ou tratamento das doenças neurodegenerativas. Estes compostos incluem os polifenóis não-fenólicos, como a curcumina (KELSEY; WILKINS; LINSEMAN, 2010).

Estudos têm mostrado os efeitos benéficos da curcumina em modelos de neurotoxicidade e neurodegeneração *in vitro* e *in vivo*. As propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, bem como a capacidade de diminuir a agregação e o acúmulo de proteínas conferem à curcumina potencial para o tratamento e prevenção de muitas condições neurológicas, entre elas as doenças neurodegenerativas, que frequentemente estão relacionadas com a agregação e acúmulo intracelular de proteínas, dano oxidativo celular e inflamação (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009; KULKARNI; DHIR, 2010).

A inibição da via de sinalização inflamatória JAK-STAT (*Janus Kinase - signal transducer and activator of transcription*) nas células da microglia sugere que a curcumina poderia reduzir a resposta inflamatória no cérebro, trazendo benefícios ao tratamento da esclerose múltipla, doença autoimune que ataca o sistema nervoso central provocando danos aos axônios e desmielinização (XIE; LI; TAKAHARA, 2011). Na linhagem celular SH-SY5Y de neuroblastoma, a curcumina reduziu a citotoxicidade, a formação de espécies reativas, a ativação da caspase-3 e a apoptose induzidas pela α -sinucleína, uma proteína importante na doença de Parkinson, que se acumula em neurônios dopaminérgicos e está relacionada com o estresse oxidativo celular (WANG et al., 2010).

As propriedades neuroprotetoras da curcumina na doença de Parkinson foram demonstradas em camundongos. A neurodegeneração e o estresse oxidativo induzidos pela 1-metil-1-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirimidina (MPTP) foram reduzidas pela curcumina. A curcumina, no corpo estriado e no mesencéfalo, reduziu a depleção de glutathione (GSH) e a peroxidação lipídica, além de ter aumentado a atividade da superóxido dismutase e da catalase (KELSEY; WILKINS; LINSEMAN, 2010; RAJESWARI, 2006).

O acúmulo de placas de β -amilóide pode levar a perda de neurônios e atrofia cerebral, o que é reconhecido como uma das principais causas da doença de Alzheimer, e a curcumina foi capaz de inibir a sua formação *in vitro* e *in vivo* (YANG et al., 2005). A curcumina reduziu a citotoxicidade da β -amilóide *in vitro* em células PC12, e os mecanismos envolvidos na redução da citotoxicidade incluíram a redução do estresse oxidativo e do influxo de cálcio (PARK et al., 2008). Em modelos animais com Alzheimer, a suplementação da dieta com curcumina associada a outros nutracêuticos, por seis meses, demonstrou benefícios na função cognitiva. Foi observada uma redução nos biomarcadores de estresse oxidativo e

inflamação, na formação de placas β -amilóide e no déficit de memória, possivelmente devido à ligação direta da curcumina aos oligômeros β -amilóide (PARACHIKOVA et al., 2010; YANAGISAWA et al., 2011).

A curcumina tem apresentado propriedades neuroprotetoras além daquelas observadas em doenças neuronais. A neurotoxicidade induzida pelo arsênio em ratos foi reduzida pelo tratamento simultâneo com a curcumina, revertendo o decréscimo nas concentrações de aminas biogênicas, como a dopamina, noradrenalina e serotonina. Foi observado que a curcumina reduziu o estresse oxidativo produzido pelo aumento da concentração de óxido nítrico nas regiões de corpo estriado, córtex frontal e hipocampo nos ratos tratados com arsênio (YADAV et al., 2010).

Nos neurônios de gânglio espiral, a curcumina reduziu os danos induzidos pelo peroxinitrito. O peroxinitrito aumentou a apoptose nos neurônios, enquanto que a curcumina reduziu os danos celulares via processos antioxidantes. A curcumina aumentou a atividade da superóxido dismutase, aumentou o conteúdo intracelular de GSH e diminuiu a produção de malondialdeído. A curcumina também reduziu a liberação do citocromo c e a expressão de proteínas da família BCL-2, consequentemente, diminuindo a apoptose nos neurônios (LIU et al., 2011).

Embora os efeitos benéficos da curcumina em diferentes condições de danos neuronais e no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas tenham sido amplamente estudados, pouco é conhecido sobre seu efeito nas neuropatias induzidas por quimioterápicos. A neuropatia induzida por quimioterápico é uma condição comum a pacientes sob tratamento com fármacos como a vincristina, vinblastina, paclitaxel e a cisplatina (ARGYRIOU et al., 2012). Assim, até o momento, não é sabido se os efeitos neuroprotetores da curcumina podem ser estendidos à neurotoxicidade induzida por agentes quimioterápicos.

1.3 Efeitos anticâncer da curcumina

Compostos naturais presentes em alimentos podem ser úteis na quimioprevenção do câncer, prevenindo a sua formação ou progressão. Estudos epidemiológicos têm atribuído a baixa incidência de câncer de cólon na Índia às propriedades quimiopreventivas e antioxidantes de uma dieta rica em curcumina. Os mecanismos pelos quais a curcumina exerce seus efeitos quimiopreventivos são

diversos. Além de atuar em diferentes níveis de regulação do processo de crescimento celular e apoptose, regulando fatores de transcrição, oncogenes e proteínas de sinalização celular, ela atua desde os processos iniciais de carcinogênese, controlando alterações cromossômicas e lesões ao DNA (DUVOIX et al., 2005; TSAO; KIM; HONG, 2004).

Biomarcadores de danos ao DNA têm sido amplamente utilizados na avaliação do risco de câncer, e nos estudos de quimioprevenção. Quebras de fita simples e dupla do DNA, como as que podem ser observadas no ensaio do cometa, e quebras cromossômicas, como as detectadas no teste do micronúcleo, geram instabilidade genômica que pode contribuir para a mutagênese e carcinogênese (BONASSI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009; SURH, 2003). A curcumina tem apresentado efeitos antimutagênicos em modelos *in vivo* e *in vitro* reduzindo os danos ao DNA induzidos por diferentes agentes físicos e químicos. A grande capacidade antioxidante e de sequestro de radicais livres, são considerados fatores importantes para o efeito da curcumina na manutenção da estabilidade genômica, uma vez que o estresse oxidativo pode modificar as bases nitrogenadas e resultar em quebras das fitas do DNA (ANTUNES et al., 2000; LI; SONG; CHEN, 1998; PREMKUMAR et al., 2004; SUBRAMANIAN et al., 1994).

Além dos efeitos antimutagênicos, foi evidenciado o potencial e antimetastático da curcumina, *in vitro* e *in vivo*, atuando em diferentes alvos moleculares. Foram observados efeitos antiangiogênicos que reduziram a densidade microvascular e produção do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF - *vascular endothelial growth factor*), interferindo na mobilidade de células cancerosas e desregulando a interação entre a integrina $\alpha 6\beta 4$ e o EGFR (LIN et al., 2009; SOUNG; CHUNG, 2011).

Pesquisas demonstraram o potencial antitumoral da curcumina em estudos *in vitro* e *in vivo*, em que ela foi capaz de inibir o crescimento de várias linhagens de células cancerosas. A curcumina exerce efeitos citotóxicos em linhagens tumorais como a MCF-7 (câncer de mama), Hep3B (hepatocarcinoma), HeLa (carcinoma cervical) e SW620 (câncer de colon) (ALAM; PANDA; CHAUHAN, 2012; NING et al., 2009; SANDUR et al., 2009). Estes estudos indicam o potencial terapêutico da curcumina nos cânceres do cérebro, mama, trato gastrointestinal, cabeça e pescoço, fígado, pâncreas, cólon, próstata e ovário (ANAND et al., 2008; KUNNUMAKKARA; ANAND; AGGARWAL, 2008).

A curcumina apresenta vantagens na terapia anticâncer em relação à quimioterapia com os fármacos convencionais, uma vez que interage com vários alvos moleculares, enquanto que muitos quimioterápicos convencionais regulam apenas um ou poucos alvos moleculares. A curcumina diminui a ativação de fatores de transcrição relacionados com a carcinogênese, como o ativador de proteína 1 (AP-1), os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs) e o NF- κ B (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003). Além disso, a curcumina tem apresentado a propriedade de inibir a progressão do ciclo celular e induzir apoptose seletivamente em células tumorais, por vias dependentes da ativação da p53 (LIU et al., 2007; WEIR et al., 2007).

A combinação da curcumina com outros agentes quimioterápicos tem apresentado resultados promissores. Nas linhagens celulares UMSCC-1 e CAL27, derivadas de câncer de cabeça e pescoço, a curcumina potencializou o efeito da cisplatina na redução do crescimento celular. A terapia adjuvante com a curcumina diminuiu o crescimento das células de carcinoma de cabeça e pescoço, mesmo quando a cisplatina foi utilizada em concentrações subótimas. Estes resultados sugerem que a combinação com a curcumina possibilita a redução das doses de cisplatina, obtendo-se uma efetiva redução no crescimento de tumores, enquanto os efeitos tóxicos da cisplatina podem ser minimizados (WILKEN et al., 2011).

Outros estudos também mostraram que a curcumina possui efeito sinérgico com quimioterápicos como o paclitaxel, oxaplatina, doxorrubicina e a vincristina, sensibilizando células tumorais de diferentes tipos de cânceres, como os da bexiga e da próstata (GOEL; AGGARWAL, 2010). Em alguns tipos de cânceres, a curcumina é capaz de potencializar os efeitos da radioterapia na eliminação das células tumorais, inclusive em células que apresentam resistência a radioterapia como no câncer colorretal (SANDUR et al., 2009; SHI et al., 2012).

Além do potencial sinérgico com a quimioterapia e radioterapia, os benefícios da terapia adjuvante com a curcumina incluem prevenção ou redução dos efeitos adversos que frequentemente limitam os tratamentos com a quimioterapia e radioterapia. Pesquisas mostraram que a curcumina é capaz de proteger as células saudáveis dos efeitos tóxicos da quimioterapia e radioterapia, modulando a expressão gênica e aumentando as concentrações celulares das enzimas antioxidantes nas células saudáveis (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003; GOEL; AGGARWAL, 2010).

1.4 Cisplatina

Os efeitos anticâncer dos complexos coordenados de platina foram sugeridos inicialmente durante a investigação do campo elétrico no crescimento bacteriano. Nestes experimentos foi observado o bloqueio da divisão celular e o crescimento filamentos das bactérias, efeito atribuído à cisplatina (*cis*-diaminodicloroplatina-II). A cisplatina (cDDP) foi sintetizada pela primeira vez em 1845 e elucidada estruturalmente em 1893, sendo composta de um átomo central de platina ligado a dois átomos de cloro e dois grupos amônia em posição *cis*, como pode ser observado na Figura 3 (ROSENBERG, 1985).

Figura 3. Estrutura química da cisplatina (SIDDIK, 2003).

A cisplatina foi aprovada para uso clínico em 1978, e desde então é amplamente utilizada no tratamento de neoplasias como os cânceres da cabeça e pescoço, pulmão, trato gastrointestinal, ovário, bexiga, testículo e fígado. A cisplatina é frequentemente associada à radioterapia e a outros fármacos como gemcitabina, taxanos e alcalóides da vinca, em diferentes protocolos terapêuticos (ARMSTRONG et al., 2006; CHANG et al., 2000; STATHOPOULOS, 2010; VALLE et al., 2010).

A morte celular induzida pela cisplatina depende da sua acumulação e ativação no interior da célula, onde a mesma sofre hidrólise pela substituição dos átomos de cloro por moléculas de água, devido à menor concentração de cloreto intracelular (Figura 4). Após a hidrólise, são formados compostos altamente reativos que interagem com diferentes compostos nucleofílicos como o DNA, GSH, metionina, metalotioneínas e proteínas (KASPARKOVA; CHVALOVA; BRABEC, 2007; WANG; LIPPARD, 2005).

O efeito antitumoral da cisplatina é atribuído, sobretudo, a sua capacidade de ligação com o DNA. O principal sítio de ligação da cisplatina está localizado no

átomo de nitrogênio das bases nitrogenadas púricas, formando *crosslinks* intrafita e interfita, distorcendo a estrutura do DNA. Os *crosslinks* intrafita e interfita interferem com a transcrição e a replicação do DNA, causando alterações no ciclo celular e iniciando a apoptose. As células tumorais são particularmente sensíveis à cisplatina devido às altas taxas mitóticas e à capacidade diminuída de reparo do DNA (SIDDIK, 2003; TODD; LIPPARD, 2010).

Figura 4. Ilustração simplificada da hidrólise da cisplatina e sua interação com o DNA (WHITTAKER et al., 1998).

Evidências na literatura têm sugerido que a cisplatina induz as células à apoptose pela ativação da proteína p53, e que esta proteína tem um papel fundamental na sensibilidade das células tumorais à cisplatina (BRAGADO et al., 2007; FLOREA; BUSSELBERG, 2011). O gene supressor tumoral *Tp53* é reconhecido como um regulador crítico da progressão do ciclo celular, do reparo ao DNA e da indução de apoptose, respondendo a sinais de danos ao DNA e a outros sinais de estresse celular. A concentração celular da proteína p53 aumenta após a exposição a agentes genotóxicos. O aumento das concentrações da p53 é um processo celular complexo, que envolve a regulação da transcrição do RNAm da p53, modificações pós traducionais, aumento da estabilidade da proteína e mecanismos de degradação (KRUSE; GU, 2009).

1.4.1 Toxicidade da cisplatina

Apesar de amplamente utilizada na terapia oncológica, o tratamento com a cisplatina está associado a graves efeitos tóxicos, o que frequentemente é um fator limitante das doses empregadas. A toxicidade da cisplatina é dose-dependente e apresenta um efeito cumulativo, aumentando a incidência e severidade dos efeitos

adversos a cada ciclo da quimioterapia, interferindo na aplicação clínica e eficácia terapêutica do tratamento (ARANY; SAFIRSTEIN, 2003; RAJESWARAN et al., 2008).

A cisplatina é um composto mutagênico e carcinogênico, assim, sua utilização pode resultar na indução de cânceres secundários. As alterações no DNA provocadas pela cisplatina induzem as células a apoptose, entretanto, se a morte celular não ocorrer, as mutações podem ser fixadas nas células filhas (DIWAN et al., 1995; GREENE, 1992; WAALKES et al., 2006). A mutagenicidade da cisplatina tem sido demonstrada em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, em diferentes ensaios e biomarcadores de danos ao DNA. Os danos ao DNA causados pela cisplatina resultam em fragmentação do DNA, quebras cromossômicas e, conseqüentemente, formação de micronúcleos, causando instabilidade genômica. Estes eventos podem levar a célula a apoptose ou a fixação de mutações e, eventualmente, iniciar um processo carcinogênico (ATTIA, 2010; RJIBA-TOUATI et al., 2012).

Existem vários estudos evidenciando os efeitos genotóxicos da cisplatina. Em linfócitos humanos em culturas, ou em linhagens celulares, como nas células PC12, a cisplatina aumentou significativamente a formação de micronúcleos (KOSMIDER et al., 2004; SANTOS et al., 2012). Antunes et al. (2000) observaram um expressivo efeito mutagênico da cisplatina em células da medula óssea de ratos Wistar, sendo obtido um aumento maior do que dez vezes no número de células com aberrações cromossômicas em relação ao controle negativo. Esse efeito foi significativamente maior entre 18 e 24 horas após a administração da cisplatina, e menos expressivo após 72 horas do tratamento.

O rim é o principal órgão afetado pela toxicidade da cisplatina, podendo resultar em uma falha renal aguda ou insuficiência renal crônica. Nos rins a cisplatina se acumula, preferencialmente, nos túbulos proximal e distal localizados na região corticomedular, onde causa os principais danos celulares. A patofisiologia da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina é um processo complexo e multifatorial, e engloba danos às células dos túbulos renais, vasculares e glomerulares, o que causa alterações no fluxo sanguíneo renal e na taxa de filtração glomerular. Como consequência é observada a elevação de creatinina sérica, da excreção de eletrólitos e enzimas, além do aumento do volume urinário. A nefrotoxicidade ocorre em cerca de 25-30% dos pacientes que recebem a cisplatina, mesmo com o uso de

medidas profiláticas, como o uso da hiperhidratação e diurese forçada (ARANY; SAFIRSTEIN, 2003; SANCHEZ-GONZALEZ et al., 2011).

Além da nefrotoxicidade, a neurotoxicidade também se destaca como efeito adverso dose-limitante. Os efeitos neurotóxicos que surgem após o tratamento com cisplatina manifestam-se como uma neuropatia periférica, podendo ser graves e afetar significativamente a qualidade de vida do paciente. A neuropatia periférica é definida como uma disfunção dos neurônios periféricos, motores, sensoriais e autonômicos, resultando em sintomas de parestesia, disestesia, hipoestesia, hiperestesia, perda de propriocepção, perda da discriminação de toque e temperatura, areflexia, e dor e/ou fraqueza motora (GREGG et al., 1992; GUTIERREZ-GUTIERREZ et al., 2010).

A neuropatia periférica induzida pela cisplatina está relacionada com a dose total acumulada e com a intensidade do tratamento. Os primeiros sintomas da neuropatia periférica são geralmente observados após a administração de uma dose de 250-350 mg/m², enquanto que após a administração de uma dose acumulada de 500-600 mg/m² a maioria dos pacientes apresenta sinais evidentes da neuropatia, sendo que em pelo menos 10% dos pacientes os sintomas são graves e incapacitantes. Essa condição é predominantemente sensorial, com queixas iniciais de parestesia nas extremidades distais, que pode progredir para uma grave ataxia sensorial, podendo continuar por meses após o término do tratamento com a cisplatina (ARGYRIOU et al., 2012).

As investigações sobre a neurotoxicidade provocada pelo tratamento com a cisplatina têm aumentado significativamente. Embora os mecanismos da neurotoxicidade induzida pela cisplatina ainda não estejam completamente elucidados, estudos demonstram a perda da integridade dos axônios nos neurônios sensoriais em diferentes modelos avaliados. Evidências sugerem que as lesões aos axônios envolvem múltiplos eventos intracelulares (JAGGI; SINGH, 2012).

Outros efeitos tóxicos da cisplatina incluem a ototoxicidade, mielossupressão e efeitos gastrintestinais (WEIJL et al., 2004). Os danos induzidos pela cisplatina são complexos e multifatoriais, afetando diferentes tecidos, entretanto, um possível mecanismo comum de alteração dos sistemas antioxidantes celulares tem sido proposto (CASARES et al., 2012; JIANG et al., 2008; RAVI; SOMANI; RYBAK, 1995).

O estresse oxidativo tem sido considerado um fator crítico na toxicidade da cisplatina. Em alguns tecidos específicos, como o renal, a importância do estresse oxidativo é bem caracterizada. Além da interação direta com o DNA, a cisplatina é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio como o radical superóxido e o radical hidroxila. A indução do estresse oxidativo pela geração de espécies reativas provoca um desbalanço pró-oxidante e antioxidante na célula, podendo resultar em lesões ao DNA ou em outras macromoléculas celulares (KOSMIDER et al., 2004; MASUDA; TANAKA; TAKAHAMA, 1994). O excesso de espécies reativas de oxigênio pode ultrapassar a capacidade das defesas antioxidantes, provocando a peroxidação lipídica, modificações de proteínas e quebras no DNA, além da indução de apoptose. Os processos pelos quais as espécies reativas induzem apoptose incluem a oxidação dos lipídeos e a ativação da proteína p53 (HALLIWELL, 2001; JIANG et al., 2007).

A p53 é sinalizador importante de vias metabólicas que regulam a integridade mitocondrial, a oxidação de lipídeos e a resposta antioxidante. Níveis basais de p53 controlam várias respostas antioxidantes, limitando o estresse oxidativo. A p53 regula alvos antioxidantes como a glutathione peroxidase (GPX1) e a superóxido dismutase, e indiretamente produz NADPH, que é um cofator essencial na produção da GSH, além de influenciar a produção de precursores da GSH, contribuindo com a atividade antioxidante. Entretanto, em condições de estresse celular, a p53 contribui para a produção de espécies reativas de oxigênio, induzindo a apoptose (MADDOCKS; VOUSDEN, 2011).

Muitos complexos de platina foram sintetizados com objetivo de obter compostos mais eficazes e menos tóxicos, entretanto apenas a carboplatina e a oxaloplatina obtiveram aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) (SHAH; DIZON, 2009; WEISS; CHRISTIAN, 1993). Além da identificação de novos análogos, pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de identificar compostos capazes de reduzir a toxicidade do tratamento com cisplatina. Estas pesquisas têm se concentrado na avaliação de compostos bioativos presentes na dieta ou outros fitoquímicos de baixa toxicidade. Contudo, mesmo com as medidas profiláticas disponíveis, a toxicidade da cisplatina se manifesta em uma parcela considerável dos pacientes (ALBERS et al., 2011; MORGAN; BUIE; SAVAGE, 2012).

1.5 Modelos *in vitro* de estudo de neurotoxicidade

O estudo da neurotoxicidade induzida por quimioterápicos e de possíveis agentes neuroprotetores tem sido realizado em diferentes modelos experimentais. Geldof (1995) propôs a utilização do ensaio de crescimento de neuritos para o estudo da neurotoxicidade periférica dos quimioterápicos e de possíveis agentes neuroprotetores. Neste ensaio pode ser observado que agentes neurotóxicos como a cisplatina, o paclitaxel e a vincristina reduzem a formação dos neuritos (GELDOF, 1995; SAKAI et al., 2000).

A caracterização da formação dos neuritos nas células pode ser analisada nas células PC12 diferenciadas pelo fator de crescimento do nervo (NGF – *nerve growth factor*). A linhagem celular PC12 é proveniente de células transformadas da glândula adrenal de ratos (*Rattus norvegicus*) e utilizada como modelo para estudos de neurobiologia. As células PC12 possuem características de células neuronais que incluem a síntese, armazenamento e secreção de noradrenalina, receptores nicotínicos da acetilcolina e presença da colina acetiltransferase, da acetilcolinesterase, do ácido gama-aminobutírico e da tirosina hidroxilase (GREENE; TISCHLER, 1976).

Além das propriedades neuronais de síntese e armazenamento de catecolaminas, as células PC12 são sensíveis à presença do NGF. O NGF inicia um processo de diferenciação das PC12, bloqueando o ciclo celular, aumentando a excitabilidade elétrica, sensibilidade à acetilcolina, e iniciando um alongamento das células PC12 conhecido como crescimento dos neuritos (*neurite outgrowth*), em que as células passam a apresentar uma morfologia semelhante à de neurônios (SAKAI et al., 2000; TISCHLER; GREENE, 1978).

Em relação às neuropatias induzidas na quimioterapia, vários compostos têm sido avaliados quanto à capacidade de bloquear ou reverter esses efeitos, incluindo o ácido docohexanóico ou fatores neurotróficos e neuroprotetores. O NGF, a eritropoetina e o fator inibidor da leucemia apresentaram resultados positivos em variados modelos experimentais, porém seu uso na prática clínica é limitado devido a dificuldades na administração, problemas com estabilidade, surgimento de efeitos adversos ou ausência de eficácia em estudos clínicos (ALBERS et al., 2011).

Neste estudo, a capacidade da curcumina em reduzir a neurotoxicidade da cisplatina foi avaliada no ensaio de crescimento de neuritos em células PC12.

Considerando a possível participação do estresse oxidativo no mecanismo da neuropatia periférica induzida pela cisplatina, antioxidantes poderiam ser úteis na redução deste efeito. Compostos como a GSH, N-acetilcisteína e a vitamina E apresentaram efeitos significativos na proteção sobre a neuropatia induzida pela quimioterapia (WOLF et al., 2008). A capacidade antioxidante e neuroprotetora da curcumina sugere que este composto polifenólico poderia ser um agente efetivo na redução da neurotoxicidade induzida pela cisplatina.

1.6 Antioxidantes na quimioterapia

Agentes quimioterápicos, como a ciclofosfamida, bleomicina, doxorrubicina, etoposídeo e a cisplatina, induzem a produção de espécies reativa de oxigênio, o que pode ser um dos seus mecanismos de toxicidade em tecidos sadios. Em condições normais, as defesas antioxidantes do organismo neutralizam as espécies reativas de oxigênio, entretanto, em condições de estresse oxidativo excessivo, as defesas antioxidantes são depletadas, e as espécies reativas de oxigênio podem causar danos celulares. Durante o tratamento quimioterápico tem sido demonstrado que os pacientes têm uma queda significativa nas suas defesas antioxidantes, com redução nos níveis plasmáticos das vitaminas C e E, e elevação dos produtos da peroxidação lipídica. Estas evidências sugerem que a suplementação com antioxidantes poderia reduzir ou prevenir os efeitos adversos da quimioterapia (BLOCK et al., 2007; CONKLIN, 2000).

Alguns agentes como o dexrazoxano, a mesna e a amifostina, são utilizados para a redução dos efeitos adversos dos quimioterápicos, porém, estes agentes também possuem efeitos adversos, o que limita a sua utilização, enquanto os antioxidantes encontrados na dieta são, geralmente, considerados de menor toxicidade. A identificação de compostos antioxidantes da dieta, que possuem a capacidade de reduzir a toxicidade dos quimioterápicos em tecidos sadios é de significativo interesse no tratamento do câncer (CONKLIN, 2000; TSANG; AL-FAYEA; AU, 2009).

Vários estudos têm demonstrado os efeitos protetores dos antioxidantes sobre a toxicidade da quimioterapia. A suplementação com antioxidantes pode representar uma maneira segura e eficaz para aumentar a eficácia da quimioterapia e a qualidade de vida dos pacientes (MOSS, 2006). Estes compostos devem possuir

três características principais: não devem ser intrinsecamente tóxicos ou potencializar a toxicidade do agente quimioterápico, devem atingir concentrações suficientes nos sítios alvos onde o quimioterápico provoca injúria e não devem interferir com o efeito antitumoral do quimioterápico (RYBAK et al., 2009).

Em alguns quimioterápicos, a geração de espécies reativas de oxigênio faz parte do mecanismo de citotoxicidade nas células tumorais, fazendo com que a utilização de antioxidantes associados aos quimioterápicos seja analisada com cautela, uma vez que os efeitos dos antitumorais poderiam ser reduzidos (LAWENDA et al., 2008). Entretanto, a inserção de antioxidantes na terapia antineoplásica com complexos de platina parece não interferir na eficácia do tratamento (CONKLIN, 2004). Antioxidantes presentes na dieta, como o selênio, resveratrol, as vitaminas C e E, apresentaram efeitos protetores, reduzindo a nefrotoxicidade e neurotoxicidade da cisplatina em modelos experimentais e em estudos clínicos (DO AMARAL et al., 2008; MALIAKEL; KAGIYA; NAIR, 2008; PACE et al., 2010). Dessa forma, a grande capacidade antioxidante da curcumina sugere que a ela também poderia reduzir a toxicidade induzida pela cisplatina, sem comprometer sua citotoxicidade em células tumorais (ALI; AL MOUNDHRI, 2006; APPENROTH et al., 1997).

Neste estudo, a possibilidade da curcumina interferir no efeito antitumoral da cisplatina foi avaliada *in vitro* em culturas de células HepG2. A linhagem tumoral HepG2 é originária de um hepatocarcinoma humano, e tem sido usada nos estudos *in vitro* dos mecanismos de ação, resistência e sensibilização à cisplatina (KAWANO et al., 2012; ZHANG et al., 2009). Como a cisplatina faz parte dos protocolos de tratamento de tumores hepáticos como os hepatoblastomas e hepatocarcinomas, a linhagem HepG2 pode ser útil na avaliação da interação de agentes quimioprotetores com a cisplatina em células tumorais (LEE et al., 2009; ZHANG; NIU; ZHOU, 2010).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os possíveis efeitos e mecanismos protetores da curcumina em uma preparação hidrossolúvel sobre a citotoxicidade, neurotoxicidade e genotoxicidade da cisplatina *in vitro* e *in vivo*, bem como a sua possível interferência na eficácia antitumoral da cisplatina *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar os possíveis efeitos protetores da curcumina sobre a citotoxicidade da cisplatina em células PC12 diferenciadas e indiferenciadas.
- Avaliar a capacidade neuroprotetora da curcumina no ensaio de crescimento de neuritos.
- Analisar a expressão do gene *Tp53* por RT-qPCR em células PC12 após tratamento com curcumina, cisplatina ou suas associações.
- Avaliar se a curcumina interfere na citotoxicidade da cisplatina em células HepG2.
- Estimar o grau de absorção gastrointestinal de curcumina preparada na sua formulação hidrossolúvel, pela comparação das concentrações plasmáticas de curcumina, após dose oral de curcumina hidrossolúvel, ou curcumina padrão em ratos Wistar.
- Avaliar se o tratamento de ratos Wistar com curcumina padrão ou hidrossolúvel reduz a genotoxicidade da cisplatina na medula óssea, sangue periférico e rins.
- Avaliar se o tratamento de ratos Wistar com curcumina padrão ou hidrossolúvel modula o estresse oxidativo induzido pela cisplatina nos rins.
- Analisar a expressão do gene *Tp53* por RT-qPCR em amostras de tecido renal de ratos Wistar tratados com curcumina padrão ou hidrossolúvel, cisplatina ou suas associações.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Agentes químicos

A curcumina padrão (CAS nº 458-37-7), o padrão interno das análises cromatográficas, o sulindaco (CAS nº 38194-50-2), o dimetilsulfóxido (DMSO - CAS nº 9008-97-3) e o 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (MTT - CAS nº 298-93-1) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A curcumina DS foi gentilmente doada pelo laboratório de Física Industrial da FCFRP-USP. A mistura gelucire[®]50-13/aerosil[®] (GLA), componentes utilizados na preparação da curcumina DS, foi utilizada como controle nos experimentos em concentração equivalente a encontrada nos tratamentos com a maior concentração de curcumina DS. A cisplatina (CAS nº 15663-27-1) foi obtida na sua formulação comercial (Platinil[®]), adquirida da Quiral Química do Brasil.

Para o ensaio de crescimento de neuritos foi utilizado o kit CHEMICON's NS225 Neurite Outgrowth Assay, da Milipore[®]. O meio Ham's F12 com L-glutamina foi adquirido da Gibco[®] Invitrogen, o NGF (*nerve growth factor* 2.5S) Cat nº NC011 e a proteína purificada de laminina de rato (*mouse laminin purified protein*) Cat nº CC095, foram adquiridos da Milipore[®].

O Kit SV Total Isolation System (Promega) Cat nº #Z3100 foi utilizado para a extração do RNA total das amostras e o kit SuperScript[™] III (Invitrogen) Cat nº 18080-093 para a reação de transcriptase reversa. O SYBR Green (Power SYBR[®] Green Master Mix, Life technologies, Cat nº 4334973) foi utilizado como corante fluorescente intercalante para a reação de RT-qPCR. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Métodos utilizados nos ensaios *in vitro*

3.2.1 Linhagens celulares

A linhagem celular PC12, isolada de feocromocitoma de ratos, obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*), foi cedida pelo Prof. Dr. Antônio Cardozo

dos Santos da FCFRP-USP. As células foram cultivadas em frascos de 25 cm² e 75 cm², contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro equino inativado pelo calor, 5% de soro bovino fetal inativado pelo calor e antibióticos penicilina/estreptomicina, mantidas em atmosfera úmida, com 5% de CO₂, 95% de ar e temperatura de 37°C em incubadora HEPA CLASS 100 da Thermo ELECTRON CORPORATION. Nos experimentos as células foram utilizadas entre a 3ª e 9ª passagem após o descongelamento. As células PC12 foram diferenciadas após exposição ao NGF 50 ng/mL por 96 horas, como observado na Figura 5.

A linhagem celular HepG2, de hepatocarcinoma humano, obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*), foi cedida pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. As células foram cultivadas em frascos de 25 cm² e 75 cm², contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor e antibióticos penicilina/estreptomicina, mantidas em atmosfera úmida, com 5% de CO₂, 95% de ar e temperatura de 37°C em incubadora HEPA CLASS 100 da Thermo ELECTRON CORPORATION. Nos experimentos as células foram utilizadas entre a 3ª e 9ª passagem após o descongelamento.

Fonte: Laboratório de Nutrigenômica (FCFRP-USP).

Figura 5. Fotomicrografia de células PC12 (a) indiferenciadas e (b) diferenciadas após 96 horas de exposição ao *nerve growth factor*, na concentração de 50 ng/mL. Aumento original 400X.

3.2.2 Delineamento dos experimentos *in vitro*

O delineamento dos experimentos realizados *in vitro*, assim como as concentrações de curcumina e cisplatina utilizadas na realização dos experimentos, foram definidos com base em estudos realizados previamente pelo nosso grupo de pesquisa, outros estudos publicados na literatura e em experimentos preliminares (GARTLON et al., 2006; KLEIN; BROWN; TURNLEY, 2007; MENDONÇA et al., 2009; MENDONÇA et al., 2010; SANTOS et al., 2012; VERSTAPPEN et al., 2004). Nos experimentos *in vitro*, os ensaios foram realizados utilizando a curcumina hidrossolúvel (curcumina DS), e a mistura GLA como controle.

Nos experimentos *in vitro* foram utilizadas metodologias de avaliação da viabilidade celular, o ensaio de crescimento de neuritos e de análise da expressão gênica. Os protocolos experimentais, assim como as concentrações de curcumina DS e cisplatina utilizados, foram adequados de acordo com os objetivos propostos, e são apresentados após a descrição de cada metodologia.

3.2.3 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT, originalmente descrito por Mosmann (1983). As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços, em um volume de 100 µL, e incubadas por 24 horas antes do tratamento. Após o período de incubação, as células foram tratadas por 24 horas com a curcumina, cisplatina ou suas associações de acordo com o protocolo experimental apresentado no item 3.2.3.1, obtendo-se um volume total no poço de 200 µL. Ao término das 24 horas de tratamento, 20 µL de solução MTT 5 mg/mL foram adicionados em cada poço, e as culturas voltaram a ser incubadas por 3 horas. Ao término desse período de incubação, as placas foram centrifugadas, o meio de cultura retirado e, então, adicionados 100 µL de DMSO em cada poço. Após a adição de DMSO a placa foi levada a um agitador por 20 minutos protegida da luz, para a leitura das absorbâncias a 570 nm usando um leitor de microplacas. A porcentagem de viabilidade celular foi obtida pela relação entre a absorbância de cada poço de tratamento e a absorbância dos poços das culturas controle negativo, consideradas com 100% de viabilidade celular. Cada experimento foi realizado em triplicata.

3.2.3.1 Protocolo experimental

A avaliação da viabilidade celular foi realizada em células HepG2, e em células PC12 indiferenciadas e diferenciadas. A diferenciação das células PC12 foi realizada após a exposição ao NGF na concentração de 50 ng/mL por 96 horas.

As células HepG2 foram tratadas com curcumina ou cisplatina isoladas nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10 µg/mL, ou associando a cisplatina (10 µg/mL) e curcumina DS nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10 µg/mL.

As células PC12 indiferenciadas e diferenciadas foram tratadas com curcumina DS nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10 µg/mL, cisplatina nas concentrações de 5,0 e 10 µg/mL, e com a associação da cisplatina (5,0 ou 10 µg/mL) a curcumina DS (0,1; 1,0 ou 10 µg/mL).

O protocolo experimental para a avaliação da viabilidade em células HepG2, e em células PC12 indiferenciadas e diferenciadas está ilustrado na Figura 6.

Figura 6. Protocolo experimental para a avaliação da viabilidade celular em células HepG2, e em células PC12 indiferenciadas e diferenciadas no ensaio do MTT.

3.2.4 Ensaio de crescimento de neuritos

Este ensaio avalia a formação de neuritos pelas células PC12 estimuladas com o NGF (GELDOF, 1995). O ensaio foi realizado segundo instruções do fabricante do kit *CHEMICON's NS225 Neurite Outgrowth Assay Kit* – Milipore. As células PC12 foram incubadas por 72 horas com meio HAM F12K + 1% soro equino + 1% penicilina/streptomicina + 50 ng/mL NGF, para estimular o pré-crescimento dos neuritos. Após esse período, as células foram transferidas para o inserto que possui na parte inferior uma membrana, com poros de 1 µm, que foi previamente coberta com uma proteína de matriz extracelular. Este inserto foi inserido em um poço de

uma placa de cultura contendo o meio de diferenciação. Após este processo, as células foram tratadas com curcumina e cisplatina, isoladas ou em associação de acordo com o protocolo experimental apresentado no item 3.2.4.1. Os corpos celulares permaneceram dentro do inserto, enquanto os neuritos cresceram através da membrana para fora do inserto como pode ser observado na Figura 7. Após o período de tratamento, as células foram fixadas com metanol a -20°C . Os corpos celulares foram retirados do interior do inserto e descartados. Os neuritos permaneceram na parte exterior da membrana, e foram corados com a solução *Neurite Stain Solution*, fornecida no kit. O corante dos neuritos foi extraído com uma solução extratora e quantificado por espectrofotômetro (SHIMADZU UVmini-1240) em comprimento de onda de 562 nm.

Figura 7. Ilustração do inserto de cultura celular contendo células PC12 para o ensaio de crescimento de neuritos. NGF: *nerve growth factor*.

3.2.4.1 Protocolo experimental

Após o período de pré-crescimento dos neuritos, as células foram transferidas para os insertos e tratadas com cisplatina na concentração de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ e curcumina DS nas concentrações de $1,0$ ou $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ de acordo com o protocolo experimental ilustrado na Figura 8.

Figura 8. Protocolo experimental para o ensaio de crescimento de neuritos. GLA: mistura gelucire®50-13/aerosil®; CMN: curcumina; cDDP: cisplatina.

3.2.5 Análise da expressão do gene *Tp53* em células PC12

O tratamento das células PC12 com a curcumina, cisplatina e sua associação, para análise da expressão do gene *Tp53*, foi realizada de acordo com o protocolo experimental descrito no item 3.2.5.1. A extração do RNA total das células PC12 foi realizada com o Kit SV Total Isolation System (Promega), que inclui os passos de lise celular, purificação do RNA, tratamento com DNase e eluição do RNA. As amostras de RNA obtidas foram analisadas e quantificadas no espectrofotômetro de ultravioleta (Biophotometer PLUS), no qual além da quantificação, foi realizada a análise da pureza da amostra de RNA, levando-se em consideração as razões entre as leituras das absorvâncias nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, e 260 nm e 230 nm. Além das análises espectrofotométricas, as amostras de RNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da integridade. O gel foi submetido a uma corrente de 80V por aproximadamente 120 minutos, corado em solução de brometo de etídio e posteriormente visualizado no fotodocumentador (Bio-Rad Gel Doc XR). As amostras de RNA foram submetidas à reação de

transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit SuperScript™ III (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. O cDNA recém sintetizado foi tratado com Ribonuclease H.

Os *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos de cDNA foram desenhados com base em dados da literatura e na sequência dos genes obtidas no GeneBank. Os *primers* foram analisados com o auxílio do programa Gene Runner 3.01 (Hastings Software Inc.), com a finalidade de verificar a ocorrência de formação de dímeros, heterodímeros e grampos. Para identificação de regiões da sequência que pudessem apresentar alto grau de homologia com outras partes do genoma, foi utilizado um banco de dados denominado BLAST. Após a definição dos *primers*, estes foram sintetizados pela Sigma-Aldrich com grau de pureza CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência).

As sequências utilizadas para o gene *Tp53* foram *Tp53-forward* “CATCATCACGCTGGAAGACTC” e *Tp53-reverse* “TTCAGCTCTCGGAACATCTC”. Como genes de referência foram testados o *Actb*, o *Gapdh* e o *Hkl*. As sequências utilizadas para a *Actb* foram *Actb-forward* “TCCTGTGGCATCCATGAACT” e *Actb-reverse* “CCAGGGCAGTAATCTCTTTCTTCTG”, para o *Gapdh* foram *Gapdh-forward* “GGCATCGTGGAAGGGCTCAT” e *Gapdh-reverse* “GCCATCACGCCACAGCTTTC” e para o *Hkl*, o *Hkl-forward* “GCGAGGGGACTATGATGCT” e o *Hkl-reverse* “CGCAGTTCCTCCATGTAGC”. O gene *Actb* foi selecionado como gene de referência para as reações de qPCR.

A reação de qPCR foi realizada utilizando o corante fluorescente SYBR Green com o kit Power SYBR® Green Master Mix. As reações de qPCR foram realizadas com desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e 34 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 60 segundos. A curva de *melting* para os pares de *primers* dos genes *Tp53* e *Actb* demonstrou ausência de amplificação inespecífica, como observado na Figura 9.

Figura 9. Especificidade das reações de RT-qPCR evidenciada pela curva de *melting* para (a) o gene-alvo *Tp53* e (b) o gene de referência *Actb*.

3.2.5.1 Protocolo experimental

Para avaliação da expressão do gene *Tp53* as culturas de células PC12 foram tratadas com cisplatina (0,1 µg/mL) e curcumina DS (5,0 µg/mL), assim como a sua associação em tratamento simultâneo (cisplatina 0,1 µg/mL + curcumina DS 5,0 µg/mL), de acordo com o protocolo experimental ilustrado na Figura 10.

Figura 10. Protocolo experimental para o ensaio de expressão do gene *Tp53* em células PC12.

3.3 Métodos utilizados nos ensaios *in vivo*

3.3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, com peso inicial de aproximadamente 160 gramas. Os animais foram mantidos em caixas de contenção com três animais, em condições ambientais controladas e com ração e água oferecidas *ad libitum*. Todos os ensaios foram iniciados após um período de 48 horas para adaptação dos animais, sendo utilizados seis animais para cada grupo experimental. Após o período de experimentação, os animais foram eutanasiados e as amostras de interesse colhidas.

Este projeto de pesquisa, contendo informações pertinentes ao objetivo e métodos do trabalho, foi submetido à apreciação e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), protocolo número 08.1.1417.53.2.

3.3.2 Delineamento experimental

Os experimentos realizados *in vivo* foram conduzidos em dois protocolos experimentais. O primeiro protocolo experimental foi realizado com o objetivo de avaliar a diferença na absorção gastrointestinal da curcumina DS e da curcumina padrão. O segundo protocolo experimental foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do pré-tratamento com curcumina DS e padrão na genotoxicidade e estresse oxidativo induzidos pela cisplatina.

O protocolo experimental, assim como a dose de curcumina de 500 mg/kg m.c., utilizado para comparação da absorção gastrointestinal da curcumina DS e padrão foi definido com base em experimentos descritos na literatura que analisaram a biodisponibilidade de outras formulações de curcumina (MARCZYLO et al., 2007; YANG et al., 2007). A colheita de amostra de sangue dos animais foi realizada 15, 30, 60 ou 120 minutos após a gavagem de 500 mg/kg m.c. de curcumina DS ou curcumina padrão. As amostras foram processadas segundo descrito no item 3.3.3.

O protocolo experimental realizado com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento com a curcumina DS (5, 25 ou 50 mg/kg m.c.), ou a curcumina padrão

(50 mg/kg m.c.), isolados ou em associação com a cisplatina (6 mg/kg m.c.), na genotoxicidade, estresse oxidativo e modulação da expressão do gene *Tp53*, foi conduzido de acordo com o protocolo ilustrado na Figura 11. Após o período experimental foram colhidas amostras para análise de micronúcleos, para o ensaio do cometa, estresse oxidativo e expressão gênica, segundo metodologias descritas nos itens 3.3.4, 3.3.5, 3.3.6 e 3.3.7, respectivamente.

Após a eutanásia dos animais, os rins foram pesados para estabelecer a relação massa rim/massa corpórea. Durante o experimento, os animais foram pesados diariamente para correção das doses dos agentes administrados e para avaliar a variação da massa corpórea. Os animais receberam, por gavagem, a curcumina DS e padrão, assim como água e a mistura GLA, 72, 48, 24 horas e 30 minutos antes da administração intraperitoneal de solução salina ou cisplatina, segundo os grupos experimentais descritos a seguir:

- Grupo CN: os animais receberam água por gavagem, e solução salina i.p.;
- Grupo GLA: os animais receberam a mistura gelucire®50-13/aerosil® por gavagem, e solução salina i.p.;
- Grupo CMN DS 5: os animais receberam a curcumina DS na dose de 5 mg/kg m.c. por gavagem, e solução salina i.p.;
- Grupo CMN DS 25: os animais receberam a curcumina DS na dose de 25 mg/kg m.c. por gavagem, e solução salina i.p.;
- Grupo CMN DS 50: os animais receberam a curcumina DS na dose de 50 mg/kg m.c. por gavagem, e solução salina i.p.;
- Grupo CMN padrão 50: os animais receberam a curcumina padrão na dose de 50 mg/kg m.c. por gavagem, e solução salina i.p.;
- Grupo cDDP: os animais receberam água por gavagem, e cisplatina i.p. na dose de 6 mg/kg m.c.;
- Grupo GLA + cDDP: os animais receberam a mistura gelucire®50-13/aerosil® por gavagem, e cisplatina i.p. na dose de 6 mg/kg m.c.;
- Grupo CMN DS 5 + cDDP: os animais receberam a curcumina DS na dose de 5 mg/kg m.c. por gavagem, e cisplatina i.p. na dose de 6 mg/kg m.c.;
- Grupo CMN DS 25 + cDDP: os animais receberam a curcumina DS na dose de 25 mg/kg m.c. por gavagem, e cisplatina i.p. na dose de 6 mg/kg m.c.;

- Grupo CMN DS 50 + cDDP: os animais receberam a curcumina DS na dose de 50 mg/kg m.c. por gavagem, e cisplatina i.p. na dose de 6 mg/kg m.c.;
- Grupo CMN padrão 50 + cDDP: os animais receberam a curcumina padrão na dose de 50 mg/kg m.c. por gavagem, e cisplatina i.p. na dose de 6 mg/kg m.c.;

Figura 11. Protocolo experimental para avaliação do efeito do pré-tratamento com curcumina DS e padrão na genotoxicidade, estresse oxidativo e modulação da expressão do gene *Tp53* em ratos Wistar. CN: controle negativo, GLA: mistura gelucire[®]50-13/aerosil[®], CMN: curcumina, DS: dispersão sólida, cDDP: cisplatina.

3.3.3 Quantificação de curcumina no plasma por CLAE

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Toxicologia da FCFRP-USP. O sistema cromatográfico utilizado é composto de um cromatógrafo SHIMADZU LC-10AT VP, com uma coluna de separação cromatográfica em fase reversa C18 de 150 mm x 4,6 mm, e 5 µm de tamanho de partícula, detector UV visível SHIMADZU SPD-10A operando em 420 nm e integrador SHIMADZU C-R8A.

A fase móvel utilizada foi preparada com metanol: água: ácido acético (68: 30,4: 1,6 v/v/v). Foi utilizado método isocrático, sendo a fase móvel degaseificada por ultrasson durante 20 minutos, e a vazão da fase móvel ajustada para 1 mL/min.

Para quantificação, 1 mL de plasma foi enriquecido com 25 µL de padrão interno e seguiu-se a extração adicionando 2 mL de acetonitrila e levando a agitação em *vortex* por 1 minuto para precipitação de proteínas. A amostra foi, então, centrifugada, recolhido o sobrenadante, e logo em seguida levando o sobrenadante a secar sob fluxo de ar comprimido. Após a secar, a amostra foi ressuspensa em 100 µL de fase móvel e injetada no cromatógrafo em um *loop* de 20 µL.

A quantificação da curcumina realizada pela razão da altura dos picos da curcumina e do padrão interno, em relação a uma curva de calibração. A curva de calibração foi gerada por adição de padrão de curcumina (25 µL) e de padrão interno (sulindaco) em plasma branco, em no mínimo cinco concentrações diferentes de curcumina. Para as análises da curcumina padrão a curva de calibração foi construída nas concentrações de 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10 ng/mL e para a curcumina DS a curva analítica foi construída nas concentrações de 4,0; 10; 12; 20 e 40 ng/mL.

3.3.4 Teste do micronúcleo em células da medula óssea

O teste do micronúcleo foi realizado segundo protocolo descrito por Schmid (1975). Após o período experimental, as células da medula óssea foram colhidas dos fêmures com soro bovino fetal. Esse material foi colocado dentro de um tubo de centrífuga, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 180 g. Em seguida, uma parte do sobrenadante foi descartada e o *pellet* ressuspensa em 0,3 mL de sobrenadante. Essa suspensão celular foi utilizada para confecção dos esfregaços. Após 24 horas, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos.

As lâminas foram coradas com Giemsa diluído em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,06 mol/L e KH_2PO_4 0,06 mol/L) na proporção de 1 mL de corante para 20 mL da solução tampão por 10 minutos. As lâminas foram, então, lavadas em água destilada, secas à temperatura ambiente e analisadas em microscópio de luz (Zeiss, modelo Primostar®) em objetiva de imersão com aumento de 1000X.

Para cada animal foram analisados a frequência de micronúcleos em 2000 eritrócitos policromáticos (PCE). A relação entre o número de eritrócitos

policromáticos e eritrócitos normocromáticos (NCE), no total de 500 eritrócitos, também foi analisada para avaliação da citotoxicidade. Os critérios para identificação dos micronúcleos foram os propostos por Titenko-Holland et al. (1997), como pode ser observado na Figura 12.

Fonte: Livia Cristina Hernandez, Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP/USP

Figura 12. Fotomicrografia obtida no teste do micronúcleo em células da medula óssea de ratos Wistar. Coloração Giemsa e aumento original de 1000X. (a) Eritrócito policromático (PCE), (b) Eritrócito normocromático (NCE), (c) Eritrócito policromático micronucleado (MNPCE).

3.3.5 Ensaio do cometa em células do sangue periférico e do rim

O ensaio do cometa foi realizado segundo a metodologia proposta por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000). As amostras de sangue periférico e do rim direito foram colhidas 24 horas após a injeção intraperitoneal de salina ou cisplatina. Da amostra de rim foi preparada uma suspensão celular obtida por separação mecânica, em que aproximadamente 400 mg de tecido foram picotados em uma mistura de 1800 μ L de solução de Hanks + 200 μ L de DMSO. Alíquotas da amostra de sangue periférico e da suspensão celular do rim foram utilizadas para determinação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan.

As lâminas foram preparadas utilizando 17 μ L do sangue periférico misturados a 170 μ L de agarose de baixo ponto de fusão, e de 80 μ L de suspensão celular do rim misturadas a 240 μ L de agarose de baixo ponto de fusão. Uma alíquota de 80 μ L dessa mistura foi depositada sobre lâminas previamente

revestidas com agarose normal. As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4 °C por 15 minutos. Após esse período as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas na solução de lise recém preparada (2,5 mol/L de NaCl, 100 mmol/L de EDTA, 10 mmol/L de Tris adicionado de 1% de triton X-100 e 10% de DMSO antes do uso, pH 10) e mantidas por 24 horas a 4 °C.

Após a lise, as lâminas foram imersas em solução alcalina (300 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA, pH>13) por 20 minutos a 4 °C. Após esse período, as lâminas foram levadas à cuba de eletroforese. A eletroforese foi conduzida em solução alcalina (300 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA, pH>13) por 20 minutos com voltagem (1 V/cm) e amperagem (300 mA) constantes. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (0,4 mmol/L Tris, pH 7,5) por 5 minutos. Depois de secarem à temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 2 minutos.

No momento da análise, as lâminas foram coradas com o agente intercalante de DNA GelRED™ (0,1 µg/mL, Biotium, Hayward, Califórnia, Estados Unidos, CAS 67-68-5) por 3 minutos, e examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-AxioStar Plus, acoplado a uma câmera Zeiss-AxioCamMRc) usando filtro 515 – 560 nm e barreira de filtro de 590 nm, em objetiva de 40X. Para cada animal foram analisados 100 nucleoides em duas lâminas. As imagens dos nucleoides foram avaliadas com o auxílio do software CometAssay IV (Figura 13), sendo analisado o parâmetro *Tail intensity*, referente à porcentagem de DNA na cauda.

Fonte: Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP/USP

Figura 13. Imagens da análise de nucleoides com o software CometAssay IV. (A) Nucleoide sem dano ao DNA. (B) Nucleoide com alto grau de dano ao DNA.

3.3.6 Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e GSH tecidual

Para a quantificação de TBARS e GSH em tecido renal, foi obtido um homogenato do rim homogeneizando-se 0,2 g do órgão em 2 mL de KCl 1,15% refrigerado.

As concentrações de TBARS em tecido renal foram determinadas segundo Buege e Aust (1978). Uma alíquota de 0,5 mL do homogenato foi adicionada a 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 26 mmol/L, ácido tricloroacético 15% e HCl 0,25 mol/L. Essa mistura foi aquecida em banho-maria por 15 minutos e centrifugada por 20 minutos a 180 g. A absorbância do sobrenadante foi determinada em 535 nm (espectrofotômetro UV-Vis B582 Micronal®), sendo os resultados expressos em nmol de TBARS por mg de proteína. A quebra do produto 1,1,3,3-tetraetoxipropano foi utilizada como padrão da reação.

As concentrações de GSH em tecido renal foram determinadas segundo o método de Sedlak e Lindsay (1968). Os homogenatos das amostras foram diluídos em água (1:4), precipitados com ácido tricloroacético 50% e, posteriormente, centrifugados a 2000 g por 10 minutos. Um volume de 2,0 mL de tampão Tris-EDTA (0,2 mol/L, pH 8,9) e 0,1 mL de ácido 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 0,01 mol/L em metanol foram adicionados a uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 15 min e, em seguida, realizada a leitura em 412 nm (espectrofotômetro Rayleigh UV-1601) com uma curva padrão de α -cisteína. Os resultados foram expressos em nmol GSH/g de proteína. A quantificação das proteínas totais foi realizada em 650 nm (espectrofotômetro Rayleigh UV-1601) utilizando o método de Lowry (HARTREE, 1972).

3.3.7 Análise da expressão do gene *Tp53* em células do rim

Após a eutanásia dos animais, o rim esquerdo foi removido e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido. Aproximadamente 0,05 g do tecido renal de cada animal dos diferentes grupos experimentais foi utilizado para extração do RNA. A extração do RNA foi realizada com o Kit SV Total Isolation System (Promega) segundo instruções do fabricante. As etapas de avaliação da qualidade do RNA,

síntese do cDNA, seleção dos *primers*, e reação de qPCR foram realizadas da mesma forma previamente descrita para a análise da expressão do gene *Tp53* em células PC12. Para a análise da expressão do gene *Tp53* em células do rim também foram utilizados os pares de *primers* dos genes *Tp53* e *Actb*, anteriormente descritos para análise da expressão do gene *Tp53* em células PC12.

3.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para os ensaios *in vitro*, foram realizados três experimentos independentes, e para os experimentos *in vivo*, foi utilizado um número amostral de seis animais por grupo de tratamento. Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Os resultados do ensaio de crescimento de neuritos foram analisados pelo teste *t* de Student. Os resultados dos demais ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de comparação múltipla de Tukey, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os parâmetros avaliados.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Resultado dos experimentos *in vitro*

4.1.1 Avaliação do efeito citoprotetor da curcumina em células PC12

Os efeitos citoprotetores da curcumina DS sobre a citotoxicidade da cisplatina em células PC12 indiferenciadas e diferenciadas foram estudados pela determinação da viabilidade celular no método MTT, após tratamento das células com cisplatina (5,0 ou 10 µg/mL), curcumina DS (0,1; 1,0 ou 10 µg/mL), ou suas associações em tratamento simultâneo por 24 horas, e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

A curcumina DS, assim como a cisplatina, reduziu estatisticamente a viabilidade das células PC12 indiferenciadas na maior concentração avaliada (10 µg/mL). Os resultados mostraram que a curcumina DS não reduziu a citotoxicidade da cisplatina. Nos tratamentos com as associações de curcumina DS (0,1; 1,0 ou 10 µg/mL) e cisplatina (10 µg/mL), a viabilidade das células PC12 indiferenciadas não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao tratamento com a cisplatina (10 µg/mL) isoladamente.

As células PC12 indiferenciadas foram mais sensíveis que as células PC12 diferenciadas tanto à curcumina DS quanto à cisplatina. Nas células PC12 diferenciadas, a curcumina DS (0,1; 1,0 ou 10 µg/mL) e a cisplatina (5,0 ou 10 µg/mL), isoladamente ou em associação, não reduziram de maneira significativa a viabilidade celular.

Além da curcumina DS e cisplatina, as culturas de células PC12 indiferenciadas e diferenciadas foram tratadas com a mistura GLA. A mistura GLA isoladamente não foi citotóxica às células PC12 indiferenciadas ou diferenciadas. Nos tratamentos em associação, a mistura GLA não alterou de maneira significativa a citotoxicidade da cisplatina.

Tabela 1 - Viabilidade de células PC12 indiferenciadas (PC12) e diferenciadas (dPC12) tratadas com curcumina DS, cisplatina ou a sua associação por 24 horas, determinadas pelo ensaio do MTT

Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilidade celular	
	PC12	dPC12
Controle Negativo	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
GLA	84 $\pm$ 14	89 $\pm$ 11
CMN DS 0,1	99 $\pm$ 4	83 $\pm$ 11
CMN DS 1,0	88 $\pm$ 7	83 $\pm$ 9
CMN DS 10	67 $\pm$ 14*	80 $\pm$ 5
cDDP 5,0	74 $\pm$ 1	80 $\pm$ 12
cDDP 5,0 + GLA	72 $\pm$ 10	96 $\pm$ 20
cDDP 5,0 + CMN DS 0,1	79 $\pm$ 16	79 $\pm$ 8
cDDP 5,0 + CMN DS 1,0	74 $\pm$ 17	78 $\pm$ 14
cDDP 5,0 + CMN DS 10	52 $\pm$ 6*	81 $\pm$ 11
cDDP 10	58 $\pm$ 5*	73 $\pm$ 3
cDDP 10 + GLA	61 $\pm$ 11*	76 $\pm$ 18
cDDP 10 + CMN DS 0,1	63 $\pm$ 10*	74 $\pm$ 8
cDDP 10 + CMN DS 1,0	54 $\pm$ 14*	86 $\pm$ 12
cDDP 10 + CMN DS 10	45 $\pm$ 1*	85 $\pm$ 18

Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. CMN DS: Curcumina DS. cDDP: cisplatina. GLA: gelucire®50-13/aerosil®. *Estatisticamente diferente do controle negativo. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.1.2 Ensaio de crescimento de neuritos

O ensaio de crescimento de neuritos foi utilizado para avaliar os possíveis efeitos neuroprotetores da curcumina DS na formação dos neuritos. Os resultados dos experimentos foram expressos em porcentagem de neuritos formados, pela normalização dos resultados das absorbâncias das amostras em relação ao controle negativo. Neste ensaio foram realizados tratamentos com a cisplatina (10 $\mu\text{g/mL}$), curcumina (1,0 ou 10 $\mu\text{g/mL}$), suas associações e controles.

Os resultados apresentados na Figura 14A mostram que a curcumina e a mistura GLA não reduziram a formação de neuritos nas concentrações avaliadas. A

neurotoxicidade da cisplatina foi evidenciada pela significativa redução na formação dos neuritos. Como pode ser observado na Figura 14B, a cisplatina reduziu em 62% a formação de neuritos em relação ao controle negativo ($p<0,05$).

Os resultados apresentados na Figura 14B mostram que a curcumina reduziu a neurotoxicidade da cisplatina. A curcumina DS na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ aumentou em 18% a porcentagem de neuritos das PC12 em relação ao tratamento com a cisplatina. Entretanto, o melhor efeito neuroprotetor da curcumina DS foi observado na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, aumentando em 30% os neuritos formados ($p<0,05$).

Figura 14. (A) Efeito da curcumina DS (CMN DS), nas concentrações 1,0 ou 10 $\mu\text{g/mL}$, no crescimento de neuritos em células PC12 estimuladas pelo *nerve growth factor*. (B) Efeito da curcumina DS (1,0 ou 10 $\mu\text{g/mL}$) na redução do crescimento de neuritos induzida pela cisplatina (cDDP) na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em células PC12 estimuladas pelo NGF. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. *Estatisticamente diferente do controle negativo. #Estatisticamente diferente do grupo cisplatina. Teste t ($p<0,05$).

4.1.3 Análise da expressão do gene *Tp53* em células PC12

A análise da transcrição do RNAm do gene *Tp53* foi realizada pela técnica de RT-qPCR. O RNA foi extraído de culturas de células PC12 48 horas após o tratamento com curcumina DS (5,0 µg/mL), cisplatina (0,1 µg/mL), ou o tratamento associado de curcumina DS e cisplatina.

Amostras de RNA íntegras e com elevado grau de pureza, livre de contaminantes como etanol, lipídeos, proteínas, fenol ou clorofórmio, foram utilizadas na reação de RT-qPCR. A quantificação e o grau de pureza do RNA total foram avaliados por leitura espectrofotométrica em UV. As amostras utilizadas apresentaram concentração de RNA entre 104 e 224 µg/mL. O grau de pureza das amostras foi avaliado pelas razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} , e os valores obtidos oscilaram entre 1,80 e 2,27, indicando uma boa qualidade da amostra.

A integridade do RNA total obtido na extração foi determinada pela análise do perfil das bandas de RNA observadas em gel de agarose 1%. Como pode ser observado na Figura 15, as amostras de RNA apresentaram bandas definidas e com ausência de rastros, não apresentando evidências de degradação do RNA.

Figura 15. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para verificação da integridade das amostras de RNA. As bandas predominantes no gel correspondem ao RNA ribossomal 28S e o RNA ribossomal 18S. **1:** Controle negativo; **2** Curcumina DS 5,0 µg/mL; **3:** cDDP 0,1 µg/mL; **4:** Curcumina DS 5,0 µg/mL + cDDP 0,1 µg/mL. Gel visualizado e fotografado em fotodocumentador UV.

A transcrição do RNAm do gene *Tp53* foi determinada pelo método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que faz a relação entre o ΔC_t do gene alvo (*Tp53*) e ΔC_t do gene de referência (*Actb*). A Figura 16 mostra os efeitos da curcumina DS e cisplatina na modulação da expressão do gene *Tp53*. O tratamento das células PC12 com cisplatina aumentou duas vezes a expressão do gene *Tp53* ($p < 0,05$). Os resultados também mostraram que a curcumina DS não modulou a transcrição do RNAm do gene *Tp53*. O valor da expressão gênica relativa nas células PC12 tratadas com a curcumina DS isolada não apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo, e o resultado do tratamento associando curcumina DS e cisplatina não foi estatisticamente diferente do tratamento com a cisplatina isolada.

Figura 16. Expressão gênica relativa do *Tp53* em células PC12 após tratamento com a curcumina DS 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (CMN DS), cisplatina 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (cDDP) e suas associações por 48 horas. CN: controle negativo. O gene *Actb* foi utilizado como referência. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. *Estatisticamente diferente do controle negativo. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.1.4 Efeito da curcumina na citotoxicidade da cisplatina em células HepG2

A avaliação da viabilidade celular pelo método MTT foi utilizada para determinar a citotoxicidade da cisplatina, associada ou não à curcumina DS, nas células HepG2. Como pode ser observado nas Figuras 17-A e 17-B, a cisplatina e a curcumina DS isoladamente, na maior concentração testada (10 µg/mL), reduziram significativamente a viabilidade das células HepG2 em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). O tratamento com cisplatina nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10 µg/mL resultaram em 97, 76 e 30% de viabilidade celular, respectivamente, enquanto a curcumina DS 0,1; 1,0 ou 10 µg/mL resultaram em 87, 76 e 57% de viabilidade celular, respectivamente. Também pode ser observado que a mistura GLA não reduziu a viabilidade das células HepG2.

Figura 17. Avaliação da citotoxicidade da cisplatina (cDDP) e curcumina DS (CMN DS) em células HepG2 pelo método MTT. (A) As células foram tratadas com cisplatina nas concentrações de 0,1; 1,0 ou 10 µg/mL por 24 horas. (B) As células foram tratadas com a curcumina DS nas concentrações de 0,1; 1,0 ou 10 µg/mL por 24 horas. CN: controle negativo. GLA: gelucire[®] 50-13/aerosil[®]. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. *Estatisticamente diferente do controle negativo. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para avaliar uma possível redução da citotoxicidade da cisplatina na presença da curcumina DS, as células HepG2 foram tratadas com cisplatina na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ associada à curcumina DS nas concentrações de 0,1; 1,0 ou 10 $\mu\text{g/mL}$.

Na Figura 18, podemos observar os resultados da citotoxicidade da cisplatina em células HepG2 na presença da curcumina DS. A curcumina DS e a mistura GLA não diminuíram a citotoxicidade da cisplatina nas células HepG2, não sendo observadas diferenças estatísticas entre os resultados do tratamento com cisplatina e dos tratamentos com cisplatina associada à curcumina DS ou à mistura GLA. Neste experimento, o tratamento com cisplatina 10 $\mu\text{g/mL}$ resultou em 31% de viabilidade celular, e quando associada à curcumina DS nas concentrações de 0,1; 1,0 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ os resultados foram de 29, 25 e 31% de viabilidade celular, respectivamente.

Figura 18. Avaliação do efeito da curcumina DS (CMN DS) na citotoxicidade da cisplatina (cDDP) em células HepG2 pelo método MTT. As células foram tratadas com cisplatina na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ associada ou não com a curcumina DS nas concentrações de 0,1; 1,0 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas. CN: controle negativo. GLA: gelucire®50-13/aerosil®. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. *Estatisticamente diferente do controle negativo. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2 Resultados dos experimentos *in vivo*

4.2.1 Determinação das concentrações plasmáticas de curcumina

As concentrações plasmáticas de curcumina foram determinadas em amostras de plasma de animais que receberam a curcumina DS ou curcumina padrão. A curcumina foi extraída do plasma após precipitação de proteínas com acetonitrila e quantificada em CLAE-UV. A seletividade do método é demonstrada pelos cromatogramas do plasma branco, da extração da curcumina e o padrão interno da água e do plasma de ratos Wistar apresentados na Figura 19.

As análises cromatográficas dos plasmas brancos enriquecidos com curcumina, utilizados para preparação da curva de calibração, apresentaram uma relação linear entre a concentração e a resposta (relação altura do pico da curcumina/altura do pico do padrão interno). O coeficiente de determinação (R^2) das análises da curcumina padrão foi 0,9997, e nas análises da curcumina DS foi 0,9991. O coeficiente de variação foi menor do que 10% nas duas análises. Esta metodologia possibilitou analisar e comparar a absorção gastrointestinal da curcumina padrão ou formulada por dispersão sólida.

Figura 19. Cromatogramas da extração da curcumina por precipitação de proteínas e quantificação por CLAE/UV em plasma de ratos Wistar. (A) Extração de curcumina e padrão interno de água. (B). Plasma branco (C) Extração da curcumina e padrão interno do plasma de ratos Wistar. A letra “a” indica o pico do padrão interno e a letra “b” indica o pico da curcumina.

A formulação da curcumina em dispersão sólida aumentou significativamente a sua concentração no plasma. Os animais receberam a curcumina DS ou curcumina padrão na dose de 500 mg/kg m.c. por gavagem, e as amostras de plasma foram obtidas 15, 30, 60 ou 120 minutos após administração. Como pode ser observado na Figura 20, em qualquer tempo as concentrações plasmáticas foram maiores nos animais que receberam a curcumina DS.

As médias das concentrações plasmáticas de curcumina obtidas foram de 10,0; 16,2; 17,6 e 7,0 ng/mL após 15, 30, 60 ou 120 minutos da administração da curcumina DS, respectivamente. As médias das concentrações plasmáticas de curcumina obtidas foram de 1,4; 3,2; 1,4 e 1,4 ng/mL após 15, 30, 60 ou 120 minutos da administração da curcumina padrão, respectivamente. Nos tempos de 30 e 60 minutos após administração, os valores obtidos de concentração plasmática de curcumina diferiram estatisticamente entre a curcumina formulada por dispersão sólida e a curcumina padrão.

Figura 20. Concentração plasmática de curcumina versus tempo após administração oral por gavagem de 500 mg/kg m.c. de curcumina padrão ou curcumina DS em ratos Wistar. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão para cada tratamento (seis animais/tratamento). *Diferença estatística entre curcumina DS e curcumina padrão, no mesmo tempo após a administração. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na Tabela 2 pode ser observado que a curcumina formulada por dispersão sólida tem uma área sob a curva maior que a curcumina padrão. Também pode ser observado que a média das concentrações plasmáticas máximas foi aproximadamente cinco vezes maior, após a administração da curcumina DS, do que após a administração da curcumina padrão.

Tabela 2 - Parâmetros farmacocinéticos da curcumina DS e curcumina padrão após administração oral em ratos Wistar

Parâmetros	Curcumina DS	Curcumina padrão
ASC₀₋₁₂₀ (ng min/mL)	1.516,1	198,9
C_{max} (ng/mL)	17,6 ± 9,4	3,2 ± 1,4
T_{max} (min)	60	30

Administração oral por gavagem de 500 mg/kg m.c. de curcumina DS ou curcumina padrão em ratos Wistar. Para cada tratamento foram utilizados seis animais. DS: dispersão sólida. ASC: área sob a curva. C_{max}: concentração plasmática máxima. T_{max}: tempo para atingir a concentração plasmática máxima.

4.2.2 Variação de massa corpórea e massa relativa do rim

A variação na massa corpórea e massa relativa do rim foi verificada nos animais submetidos ao tratamento com curcumina DS ou padrão, associado ou não com a cisplatina (Tabela 3). A variação na massa corpórea foi analisada em dois períodos diferentes, sendo o primeiro entre o 1º e o 4º dia de tratamento, e o segundo período entre o 5º e 6º dia do experimento.

No primeiro intervalo analisado, compreendendo entre o 1º e o 4º dia de tratamento os animais receberam por gavagem, além de água e da mistura GLA nos grupos controles, a curcumina DS (5, 25 e 50 mg/kg m.c.) ou a curcumina padrão (50 mg/kg m.c.). Nesse período, os animais ganharam 30 g aproximadamente, ou seja, uma média de aproximadamente 10 g por dia, não sendo observadas diferenças estatísticas entre os grupos de tratamentos.

No segundo intervalo analisado, compreendendo entre o 4º e 5º dia do experimento, os animais receberam cisplatina (6 mg/kg m.c.) ou salina via i.p., associada ou não ao pré-tratamento com a curcumina DS e padrão. Nesse período, os animais que receberam a cisplatina ganharam menos de 3 g, uma redução no ganho de peso significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). Também pode ser observado que o pré-tratamento com a curcumina DS ou padrão não teve efeito

na redução de ganho de peso ocasionada pela cisplatina, assim como a mistura GLA.

A massa relativa do rim foi expressa em porcentagem, e em todos os grupos de tratamento a massa do rim foi de 0,9 a 1,03% da massa corpórea, não sendo observadas diferenças estatísticas entre os grupos de tratamentos e o grupo controle negativo.

Tabela 3 - Variação na massa corpórea dos ratos Wistar durante o período experimental e porcentagem de massa do rim em relação à massa corpórea

Grupos	Variação na massa corpórea (g) no intervalo 1^a	Variação na massa corpórea (g) no intervalo 2^b	Massa rim/massa corporal^c
CN	29,7 ± 6,4	11,3 ± 2,1	0,98 ± 0,03
GLA	31,3 ± 5,6	9,3 ± 4,7	1,01 ± 0,04
CMN DS 5	31,2 ± 6,6	11,0 ± 2,8	0,93 ± 0,05
CMN DS 25	28,0 ± 4,6	9,2 ± 7,3	0,93 ± 0,09
CMN DS 50	25,5 ± 8,2	8,5 ± 1,0	1,00 ± 0,11
CMN padrão 50	31,7 ± 6,6	8,2 ± 2,4	0,96 ± 0,05
cDDP	34,0 ± 4,3	0,6 ± 3,9*	1,03 ± 0,04
GLA + cDDP	27,5 ± 6,1	0,8 ± 2,2*	1,02 ± 0,11
CMN DS 5 + cDDP	29,7 ± 3,8	1,8 ± 1,5*	0,97 ± 0,05
CMN DS 25 + cDDP	26,7 ± 5,8	2,3 ± 4,8*	0,97 ± 0,06
CMN DS 50 + cDDP	23,0 ± 5,3	0,2 ± 4,5*	1,00 ± 0,09
CMN padrão 50 + cDDP	31,8 ± 4,7	-0,8 ± 2,5*	0,90 ± 0,06

CN: controle negativo. GLA: gelucire[®]50-13/aerosil[®]. CMN: curcumina. DS: dispersão sólida. cDDP: cisplatina. ^a Intervalo 1: variação na massa corpórea, em gramas, entre os dias 1 e 4 do período experimental. ^b Intervalo 2: variação na massa corpórea, em gramas, entre o dia 4 e 5 do período experimental. ^c Resultados expressos em porcentagem. Valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo (seis animais/grupo). * Estatisticamente diferente do grupo controle negativo. ANOVA e pós-teste de Tukey (p<0,05).

4.2.3 Antigenotoxicidade da curcumina

A capacidade da curcumina DS ou curcumina padrão em reduzir os danos ao DNA induzidos pela cisplatina foi avaliada pelo teste do micronúcleo e pelo ensaio do cometa. O teste do micronúcleo foi realizado em células da medula óssea, enquanto o ensaio do cometa foi realizado em células do rim e do sangue periférico.

No teste do micronúcleo em células da medula óssea foram analisadas a relação PCE/NCE + PCE e a frequência de MNPCE/1000 PCE. A relação PCE/NCE + PCE apresentada na Tabela 4 mostra que não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o controle negativo, indicando que nenhum dos tratamentos alterou a taxa de divisão das células da medula óssea.

Tabela 4 - Relação (%) entre eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos totais (PCE+NCE) na medula óssea de ratos Wistar após eutanásia

Grupos	PCE/PCE + NCE (%)
CN	52,6 ± 4,6
GLA	54,7 ± 6,5
CMN DS 5	59,3 ± 6,2
CMN DS 25	53,4 ± 10,4
CMN DS 50	43,2 ± 6,0
CMN padrão 50	55,7 ± 8,8
cDDP	49,9 ± 5,6
GLA + cDDP	44,8 ± 4,9
CMN DS 5 + cDDP	51,8 ± 5,9
CMN DS 25 + cDDP	53,9 ± 8,3
CMN DS 50 + cDDP	51,1 ± 3,0
CMN padrão 50 + cDDP	51,0 ± 7,5

CN: controle negativo. GLA: gelucire[®]50-13/aerosil[®]. CMN: curcumina. DS: dispersão sólida. cDDP: cisplatina. Valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo (seis animais/grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos. ANOVA e pós-teste de Tukey (p<0,05).

Na Figura 21, pode ser observado o efeito da curcumina DS ou curcumina padrão, associadas ou não a cisplatina, na formação de micronúcleos. A curcumina DS ou padrão, assim como a mistura GLA, não induziram a formação de micronúcleos. Entretanto, a cisplatina aumentou de maneira significativa a frequência de MNPCE (13,08 MNPCE/1000 PCE) em relação ao controle negativo (1,25 MNPCE/1000 PCE) ($p < 0,05$).

A curcumina DS (5, 25 e 50 mg/kg m.c.) e a curcumina padrão (50 mg/kg m.c.), reduziram de maneira significativa ($p < 0,05$) a formação de micronúcleos induzida pela cisplatina, como pode ser observado na Figura 21. Este efeito ocorreu de maneira semelhante entre a curcumina DS ou curcumina padrão. A frequência de MNPCE nos animais tratados com a curcumina DS, em qualquer dose avaliada, não apresentou diferença estatística em relação ao tratamento com curcumina padrão.

Figura 21. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) na medula óssea de ratos Wistar. CN: controle negativo. GLA: gelucire®50-13/aerosil®. CMN: curcumina. DS: dispersão sólida. cDDP: cisplatina. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de cada grupo (seis animais/grupo). *Estatisticamente diferente do controle negativo. #Estatisticamente diferente do grupo cisplatina. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

No ensaio do cometa, a determinação da extensão dos danos ao DNA foi realizada pelos parâmetros de porcentagem de DNA na cauda do nucleóide (%DNA). A viabilidade celular dos tecidos analisados foi superior a 70% em todos os grupos analisados e os resultados obtidos no ensaio do cometa, em células do rim e do sangue periférico, estão apresentados na Tabela 5.

Os resultados mostraram ausência de efeitos genotóxicos da curcumina DS ou padrão, em células do rim e do sangue periférico. Os resultados do tecido renal e do sangue periférico dos animais tratados com curcumina DS ou padrão, em todas as doses avaliadas, não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle negativo. O tratamento dos animais com a mistura GLA não alterou a % DNA nos dois tecidos analisados.

No ensaio do cometa os resultados da % DNA dos animais tratados com cisplatina apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle negativo no tecido renal. Entretanto, no sangue periférico não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados com a cisplatina e o controle negativo.

Os resultados observados no tecido renal dos animais tratados com curcumina DS ou padrão, associados à cisplatina, não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos animais tratados somente com cisplatina. O tratamento dos animais com a mistura GLA associada a cisplatina, também não apresentou diferenças estatísticas em relação ao tratamento com a cisplatina isoladamente.

Tabela 5 - Porcentagem de DNA na cauda de nucleoides obtidos no ensaio do cometa em células do rim e do sangue periférico

Grupos	%DNA na cauda	
	Rim	Sangue periférico
CN	7,4 ± 4,0	4,4 ± 2,1
GLA	8,3 ± 2,9	2,6 ± 0,7
CMN DS 5	9,4 ± 2,8	4,7 ± 1,6
CMN DS 25	6,7 ± 1,7	4,8 ± 0,6
CMN DS 50	7,5 ± 3,0	2,1 ± 1,1
CMN padrão 50	5,5 ± 2,8	3,2 ± 0,9
cDDP	3,4 ± 1,1*	2,5 ± 0,4
GLA + cDDP	3,8 ± 0,7*	2,2 ± 0,8
CMN DS 5 + cDDP	5,0 ± 1,1	3,0 ± 1,7
CMN DS 25 + cDDP	6,4 ± 1,1	4,4 ± 1,2
CMN DS 50 + cDDP	5,7 ± 1,1	3,3 ± 1,5
CMN padrão 50 + cDDP	4,0 ± 0,8	2,1 ± 0,6

CN: controle negativo. GLA: gelucire®50-13/aerosil®. CMN: curcumina. DS: dispersão sólida. cDDP: cisplatina. Valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo (seis animais/grupo). Para cada grupo experimental foram analisados 600 nucleoides. *Estatisticamente diferente do controle negativo. ANOVA e pós-teste de Tukey (p<0,05).

4.2.4 Avaliação do estresse oxidativo

Os parâmetros de estresse oxidativo avaliados foram a concentração de GSH e TBARS no tecido renal 24 horas após a administração da cisplatina. As concentrações de GSH e TBARS foram expressas em função da concentração de proteínas nas amostras analisadas.

A cisplatina, curcumina DS e padrão, isoladas ou em associação, não alteraram significativamente as concentrações de GSH e TBARS. Como pode ser observado na Tabela 6, os resultados da concentração de GSH e TBARS de qualquer grupo de tratamento, não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle negativo.

Tabela 6 - Avaliação do estresse oxidativo em rim de ratos Wistar tratados com curcumina, cisplatina ou suas associações

Tratamentos	GSH	TBARS
	(nmol/mg proteína)	(nmol/mg proteína)
CN	18,9 ± 0,4	0,271 ± 0,024
GLA	17,7 ± 2,6	0,231 ± 0,023
CMN DS 5	14,2 ± 1,3	0,251 ± 0,026
CMN DS 25	15,3 ± 1,1	0,232 ± 0,026
CMN DS 50	17,2 ± 1,7	0,279 ± 0,037
CMN padrão 50	14,4 ± 1,2	0,236 ± 0,018
cDDP	15,2 ± 3,5	0,252 ± 0,063
GLA+ cDDP	18,5 ± 0,6	0,251 ± 0,028
CMN DS 5 + cDDP	16,6 ± 1,3	0,204 ± 0,018
CMN DS 25 + cDDP	14,0 ± 1,7	0,194 ± 0,017
CMN DS 50 + cDDP	19,1 ± 2,5	0,228 ± 0,040
CMN padrão 50 + cDDP	17,0 ± 1,4	0,210 ± 0,055

CN: controle negativo. GLA: gelucire®50-13/aerosil®. CMN: curcumina. DS: dispersão sólida. cDDP: cisplatina. Valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo (seis animais/grupo). Os resultados não apresentaram diferenças estatísticas. ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2.5 Análise da expressão do gene *Tp53* em células do rim

A transcrição do RNAm do gene *Tp53* em células do rim foi realizada por RT-qPCR. O grau de pureza e integridade do RNA utilizado para análise da expressão gênica indicou uma boa qualidade. A pureza das amostras de RNA extraídas de células do rim foi avaliada por espectrofotometria em UV, e os valores obtidos para as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} foram acima de 1,8. No gel de agarose 1% as amostras de RNA não apresentaram evidências de degradação.

Na Tabela 7 pode ser observado o efeito da curcumina DS ou curcumina padrão, associada ou não à cisplatina, na expressão do gene *Tp53* em células do rim determinada pelo método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os resultados

mostraram que a curcumina DS, curcumina padrão e a cisplatina, não alteraram de maneira significativa a expressão do gene *Tp53*. A expressão do gene *Tp53* nos animais tratados com curcumina DS ou padrão associados à cisplatina, foi estatisticamente maior do que nos animais do grupo controle negativo. Entretanto, os resultados da expressão gênica nos animais tratados com a curcumina DS não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao tratamento com a curcumina padrão, tanto nos tratamentos isolados quanto em associação.

Tabela 7 - Expressão gênica relativa do *Tp53* no rim de ratos Wistar tratados com a curcumina, cisplatina e suas associações

Grupos	Expressão gênica relativa do <i>Tp53</i>
CN	1,00 ± 0,0
CMN DS 50	0,93 ± 0,21
CMN padrão 50	1,40 ± 0,10
cDDP	1,29 ± 0,70
CMN DS 50 + cDDP	2,76 ± 0,27*
CMN padrão 50 + cDDP	2,83 ± 1,19*

CN: controle negativo. GLA: gelucire[®]50-13/aerosil[®] CMN: curcumina. DS: dispersão sólida. cDDP: cisplatina. O *Actb* foi utilizado como gene de referência. Valores representam a expressão do gene *Tp53* no grupo (seis animais/grupo). *Estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,05). ANOVA e pós-teste de Tukey (p<0,05).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Um grande número de plantas e seus compostos, como os flavonoides, polifenóis e outros fitoquímicos, tem recebido atenção por apresentarem efeitos biológicos potencialmente úteis na terapia de doenças. Os compostos fenólicos ou os polifenóis constituem um amplo grupo de metabólitos secundários de plantas e ocorrem naturalmente, sendo encontrados em quantidades significativas em vegetais, frutas e bebidas (SOOB RATTEE et al., 2005). Os polifenóis encontrados em plantas são conhecidos como agentes multifuncionais e apresentam uma ampla variedade de efeitos biológicos, sendo muitas das suas propriedades atribuídas a sua capacidade antioxidante (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

A curcumina é um composto polifenólico com grande potencial terapêutico demonstrado em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Ela é uma molécula biologicamente ativa e considerada segura, sendo utilizada há muitos anos sem evidências significativas de toxicidade. Estudos em animais e estudos clínicos mostraram que a curcumina é segura mesmo em altas doses. Em estudos clínicos fase I com pacientes ingerindo doses de 8 g/dia por três meses, e com pacientes ingerindo dose única de 12 g, a curcumina mostrou-se bem tolerada (CHENG et al., 2001; LAO et al., 2006).

Os efeitos farmacológicos da curcumina e os dados de segurança da sua ingestão, mesmo em altas doses, fazem deste polifenol um composto em potencial para o tratamento e prevenção de uma grande variedade de doenças. Entretanto, concentrações farmacologicamente ativas de curcumina são encontradas apenas em tecidos expostos diretamente, como ocorre no tecido coloretal, comprometendo sua aplicação terapêutica (ANAND et al., 2007; HSU; CHENG, 2007).

A curcumina, assim como outros compostos antioxidantes como a N-acetilcisteína, amifostina, ácido lipóico e as vitaminas C e E, tem sido avaliada quanto a sua capacidade de reduzir os efeitos tóxicos dos quimioterápicos em tecidos sadios (KELSEY; WILKINS; LINSEMAN, 2010; PRASAD, 2004; SELVAKUMAR et al., 2006; SWAMY et al., 2012; WU; MULDOON; NEUWELT, 2005). Na quimioterapia é muito frequente a ocorrência de complicações no tratamento devido ao desenvolvimento de efeitos tóxicos, o que muitas vezes é um fator limitante das doses utilizadas e pode ser um evento determinante para a interrupção do tratamento. O estresse oxidativo celular gerado pelos

quimioterápicos, seja pela geração direta de espécies reativas ou pela depleção dos sistemas antioxidantes da célula, resultando em efeitos tóxicos a tecidos não tumorais, sugere que a utilização de antioxidantes poderia ser benéfica, reduzindo seus efeitos adversos (BROZOVIC; AMBRIOVIC-RISTOV; OSMAK, 2010; CONKLIN, 2004).

Antunes, Darin e Bianchi (2000) observaram que a curcumina padrão na dose de 8 mg/kg m.c. não reverteu significativamente a nefrotoxicidade e peroxidação lipídica induzida pela cisplatina em ratos Wistar, porém esses resultados podem ter sido influenciados pela baixa biodisponibilidade da curcumina. Uma maior biodisponibilidade da curcumina poderia viabilizar a sua utilização terapêutica. A formulação da curcumina em dispersão sólida pode favorecer, além de uma maior biodisponibilidade, o aumento da sua estabilidade em preparações farmacêuticas e a viabilidade técnica de formulações contendo curcumina. Entretanto, não é possível afirmar se o processo técnico de produção das dispersões sólidas contendo curcumina influencia no seu efeito farmacológico. Assim, é importante avaliar se a preparação da curcumina em dispersões sólidas terá um impacto positivo ou negativo nos seus efeitos biológicos.

5.1 Experimentos *in vitro*

Em nosso estudo foi investigado o potencial da curcumina DS reduzir a neurotoxicidade induzida pela cisplatina em um modelo *in vitro*. A neuropatia periférica é um efeito adverso comum a alguns quimioterápicos, como a cisplatina, paclitaxel e vincristina. O uso de agentes antioxidantes neuroprotetores poderia reduzir a neurotoxicidade desses quimioterápicos, possibilitando uma quimioterapia mais intensa e eficaz (VERSTAPPEN et al., 2004). As propriedades antioxidantes e neuroprotetoras da curcumina sugerem que este composto polifenólico poderia atenuar a neurotoxicidade da cisplatina, ou talvez auxiliar na elucidação dos mecanismos de neurotoxicidade deste quimioterápico e no desenvolvimento de novos agentes neuroprotetores (GOEL; AGGARWAL, 2010; KELSEY; WILKINS; LINSEMAN, 2010).

A capacidade neuroprotetora da curcumina DS sobre a neurotoxicidade da cisplatina foi avaliada no ensaio de crescimento de neuritos e pela avaliação da viabilidade celular em células PC12 e dPC12. Foi possível observar que a curcumina

DS reduziu a neurotoxicidade da cisplatina, diminuindo a inibição do crescimento de neuritos induzida pela cisplatina. No ensaio de crescimento de neuritos, a neurotoxicidade dos quimioterápicos é evidenciada pela redução da formação dos prolongamentos neuríticos (GELDOF, 1995). Klein, Brown e Turnley (2007) observaram que o tratamento com cisplatina por 24 horas, em concentrações até 10 µg/mL, resultou em uma redução de até 65% na formação de neuritos. No estudo da neuroproteção da amifostina, Verstappen et al. (2004) observaram 61% de redução na formação dos neuritos nas células PC12 tratadas com a cisplatina na concentração de 10 µg/mL.

Nos nossos experimentos, a cisplatina na concentração de 10 µg/mL reduziu em 62% a formação dos neuritos, e a curcumina DS reduziu em até 50% o efeito da cisplatina na formação dos neuritos. Xiao et al. (2010) mostraram efeitos neuroprotetores da curcumina nas alterações morfológicas dos neuritos de células SK-N-SH (neuroblastoma) expostas à β -amilóide. No mesmo estudo com as células SK-N-SH, foi demonstrando papel fundamental das hidroxilas fenólicas na ação neuroprotetora da curcumina.

Na avaliação da viabilidade celular pelo método MTT, as células dPC12 foram mais resistentes à citotoxicidade da cisplatina, não sendo observado redução significativa na viabilidade celular. Nas células PC12, a curcumina DS e a cisplatina na concentração de 10 µg/mL foram citotóxicas, e a curcumina DS não modulou a citotoxicidade da cisplatina quando utilizadas em associação. A diferença da sensibilidade das PC12 e dPC12 possivelmente está relacionada com características pós-mitóticas das dPC12 e replicantes das PC12 (SHIMOKE; SASAYA; IKEUCHI, 2011).

Os resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade da cisplatina nas células PC12 e dPC12 e no ensaio de crescimento de neuritos, sugerem que a morte celular não é o principal evento na neuropatia periférica induzida pela cisplatina, e que a neurotoxicidade da cisplatina está mais relacionada com a toxicidade nos neuritos. Além do potencial uso dos agentes neuroprotetores na quimioterapia, a identificação de fatores que protegem os neuritos pode contribuir para a elucidação dos mecanismos responsáveis pelas neuropatias induzidas por agentes antineoplásicos (KLEIN; BROWN; TURNLEY, 2007).

Estudos prévios em células PC12 demonstraram efeitos antineoplásicos da curcumina, em que a cisplatina induziu a formação de micronúcleos, e a curcumina

padrão foi efetiva na redução dos danos ao DNA induzidos pela cisplatina (MENDONÇA et al., 2009). A resposta da célula frente aos danos ao DNA é um elemento crítico na manutenção da integridade do genoma. A p53 tem um papel central na regulação das respostas celulares aos danos ao DNA, controlando a progressão do ciclo celular e a indução da apoptose (BHANA; LLOYD, 2008). Salazar; Sordo e Ostrosky-Wegman (2009) mostraram uma correlação positiva entre a formação de micronúcleos e o aumento dos níveis da p53 em células RKO de carcinoma colorretal humano, tratadas com diferentes agentes genotóxicos. Assim, devido a relação entre a formação de micronúcleos e o aumento das concentrações da p53, avaliamos a influência da curcumina na expressão do gene *Tp53* em células PC12 tratadas com cisplatina.

A cisplatina aumentou a expressão do gene *Tp53* nas células PC12. A relação entre os danos ao DNA induzidos pela cisplatina e a indução da expressão do RNAm da p53 foi observada em linfócitos humanos, em que a cisplatina induziu a formação de micronúcleos e aumentou a expressão do RNAm da p53 (KOSMIDER et al., 2004; KOSMIDER et al., 2006). Nas células PC12, o tratamento com a curcumina DS associado à cisplatina, não alterou a expressão do RNAm da p53 em relação ao tratamento com a cisplatina isoladamente.

Na análise de micronúcleos pode ser avaliado o índice de proliferação celular, que permite analisar a influência dos tratamentos na progressão do ciclo celular (FENECH, 2007; SURRALLS et al., 1995). Salazar; Sordo e Ostrosky-Wegman (2009) mostraram a relação entre a redução no índice de proliferação celular, e a atividade da p53 no controle do ciclo celular. Mendonça et al., (2009) observaram no teste do micronúcleo em células PC12, que a cisplatina diminuiu o índice de proliferação celular, e a curcumina não interferiu neste parâmetro.

A p53 é um importante sinalizador da resposta aos danos ao DNA induzidos pela cisplatina (CEPEDA et al., 2007; WANG; LIPPARD, 2005). De maneira geral, é aceito que o DNA genômico é o principal alvo de ação da cisplatina, e fundamental para sua citotoxicidade nas células tumorais (CEPEDA et al., 2007; JIANG; DONG, 2008; WANG; LIPPARD, 2005). A resposta celular aos danos ao DNA é um evento complexo que envolve múltiplas proteínas e cascatas de sinalização, geralmente incluindo sensores de danos ao DNA, transdutores e efetores, que vão executar a parada do ciclo celular, reparo do DNA ou apoptose (JIANG; DONG, 2008). Assim, a perda da função da p53 pode influenciar nos efeitos terapêuticos da cisplatina,

reduzindo a apoptose mediada pela p53 em resposta aos danos ao DNA (BHANA; LLOYD, 2008).

A curcumina reduziu os danos ao DNA nas células PC12 sem interferir no bloqueio do ciclo celular induzido pela cisplatina (MENDONÇA et al., 2009). Como pôde ser observado a curcumina DS não alterou a expressão do gene *Tp53*. Estes resultados sugerem que a redução dos danos ao DNA, pela curcumina, nas células PC12 não foi relacionada com a modulação da expressão do gene *Tp53*. Os resultados obtidos no nosso trabalho sugerem que os efeitos protetores da curcumina não dependem da inativação da p53, possibilitando benefícios da curcumina na quimioterapia, sem interferir na apoptose mediada pela p53.

Os resultados da avaliação da citotoxicidade da associação da curcumina DS e cisplatina nas células HepG2 mostraram que a curcumina não reduziu a atividade antitumoral da cisplatina nesta linhagem. Foi demonstrado neste estudo que a curcumina DS, em tratamento simultâneo, não reduziu a citotoxicidade da cisplatina nas células HepG2. A linhagem HepG2 foi recentemente utilizada em um estudo de mecanismos de sensibilidade e resistência à cisplatina (ZHANG; NIU; ZHOU, 2010). A cisplatina pode ser utilizada em um grande número de protocolos de tratamento de tumores, entre eles, nos tratamentos de hepatoblastoma e carcinoma hepatocelular (GO; ADJEI, 1999; LEUNG et al., 1999).

A associação de curcumina com a cisplatina também foi avaliada na linhagem celular HA22T/VGH de carcinoma hepatocelular. Nesse estudo, a curcumina e a cisplatina apresentaram um efeito sinérgico na indução de apoptose nas células HA22T/VGH. Na mesma linhagem, a curcumina inibiu o crescimento celular e induziu a apoptose. Os autores argumentam que a morte celular induzida pela curcumina pode estar relacionada com um mecanismo pró-oxidante dependente da concentração (NOTARBARTOLO et al., 2005).

Estudos em linhagens tumorais mostraram efeitos antitumorais e sensibilizantes da curcumina. A curcumina reduziu o crescimento de células de neuroblastoma humano *in vitro* independente da ativação da p53 e da caspase-3, e a inibição da p53 não reduziu a citotoxicidade da curcumina. Nas concentrações citotóxicas em células de neuroblastoma, a curcumina não foi citotóxica em culturas de neurônios e astrócitos, indicando que a curcumina pode ser efetiva no tratamento do neuroblastoma sem causar efeitos deletérios nas células normais do sistema nervoso (SUKUMARI-RAMESH et al., 2011; ZANOTTO-FILHO et al., 2011). A

cisplatina e a doxorrubicina são efetivas na quimioterapia de neuroblastoma, e a curcumina potencializou o efeito apoptótico tanto da cisplatina como da doxorrubicina nas células de neuroblastoma *in vitro* (KING et al., 2011; SUKUMARI-RAMESH et al., 2011).

A curcumina DS reduziu a toxicidade neurítica induzida pela cisplatina em um modelo neuronal *in vitro*, sugerindo que em adição às suas propriedades antitumorais, a curcumina tem potencial na proteção sobre a neuropatia induzida pela cisplatina. O tratamento dos efeitos adversos da cisplatina, como a neuropatia periférica, poderia propiciar uma terapia mais intensa e efetiva.

5.2 Experimentos *in vivo*

A natureza lipofílica da curcumina, e consequentemente sua baixa solubilidade em soluções aquosas, combinada ao seu rápido metabolismo, resultam em uma baixa biodisponibilidade quando administrada via oral, o que tem sido considerado um fator limitante para sua aplicação terapêutica (SHARMA; STEWARD; GESCHER, 2007). A baixa biodisponibilidade da curcumina foi demonstrada por Wahlstrom e Blennow (1978) em que, após dose oral de 1 g/dia em ratos, foram detectadas baixas concentrações plasmáticas e 75 % da curcumina foi excretada nas fezes. Pan, Huang e Lin (1999) detectaram a concentração de 0,13 µg/mL em plasma de ratos após 15 minutos da administração de uma dose oral de 1 g/Kg m.c. de curcumina, e de 0,22 µg/mL após 1 hora.

Yang et al. (2007) obtiveram uma concentração plasmática máxima de $0,06 \pm 0,01$ µg/mL aproximadamente 40 minutos após administração de uma dose oral de curcumina de 500 mg/kg m.c. em ratos. Ireson et al. (2002) relataram que após dose única via oral de 500 mg/kg m.c. em ratos, a curcumina foi detectada no plasma em uma concentração de 1,8 ng/mL. Em nosso estudo, a concentração plasmática máxima de 3,2 ng/mL foi observada após 30 minutos da dose oral de 500 mg/kg m.c. de curcumina padrão.

No primeiro estudo clínico realizado com a curcumina, o pico de concentração plasmática foi obtido de 1 a 2 horas após a administração oral, e a concentração plasmática máxima foi de $1,77 \pm 1,87$ µM após a administração da dose de 8g (CHENG et al., 2001). Lao et al. (2006) detectaram curcumina apenas no plasma dos indivíduos que ingeriram dose maior do que 10 g/dia. Em uma dose oral de 3,6

g/dia a curcumina foi detectada em amostras de tecido colorretal, mas não foi detectada no plasma (IRESON et al., 2002; SHARMA et al., 2004).

Os principais fatores que contribuem para a baixa biodisponibilidade da curcumina são a baixa absorção no trato gastrointestinal, quando administrada via oral, e seu rápido metabolismo. Uma das alternativas para aumentar a biodisponibilidade da curcumina é a inibição do seu metabolismo por meio da administração concomitante de piperina. Entretanto, este artifício pode resultar em interações medicamentosas, aumentando a biodisponibilidade de outros fármacos e diminuindo a taxa de eliminação destes (DHILLON et al., 2008; SHAIKH et al., 2009).

A solubilidade reduzida da curcumina em água tem sido considerada como um fator importante na limitação da sua absorção no trato gastrointestinal, e a utilização de formulações ou veículos que aumentam a solubilidade em água tem sido uma estratégia para aumentar a sua absorção e biodisponibilidade. A curcumina formulada em nanopartículas aumentou significativamente a solubilidade em água, e quando preparada em uma formulação contendo fosfatidilcolina (Meriva®), aumentou em cinco vezes a absorção no trato gastrointestinal (BISHT et al., 2007; MARCZYLO et al., 2007).

A curcumina formulada na dispersão sólida ternária por *spray dry* curcumina/aerosil®/gelucire®50-13 demonstrou um significativo aumento na solubilidade em água e aumento na absorção gastrointestinal em ratos. Nossos resultados mostraram que os níveis plasmáticos de curcumina foram maiores após sua administração na forma hidrossolúvel. A concentração plasmática máxima em ratos obtida após dose oral de 500 mg/kg m.c. de curcumina DS foi 17,60 ng/mL, cinco vezes maior do que na administração da curcumina padrão.

Nas formulações de fármacos a adição do gelucire forma microemulsões, aumentando a molhabilidade e solubilidade dos fármacos no trato gastrointestinal, resultando em aumento da biodisponibilidade de fármacos lipofílicos. O aumento da solubilidade em água também tem sido uma estratégia para melhorar a biodisponibilidade de substâncias lipossolúveis, como o piroxicam, ritonavir e o propranolol, que tiveram sua hidrossolubilidade e absorção aumentadas quando formulados com o gelucire (MEHUYS et al., 2005; YUKSEL et al., 2003).

Uma maior biodisponibilidade da curcumina poderia viabilizar a sua utilização no tratamento e prevenção de várias doenças. Como agente anticâncer,

possibilitaria a utilização da curcumina como agente antitumoral, quimiopreventivo ou quimioprotetor. A maior biodisponibilidade da curcumina sugere que seus efeitos biológicos podem ser intensificados, assim como um maior efeito antigenotóxico. A curcumina é um conhecido agente antioxidante e antigenotóxico, e tem sido amplamente utilizada em estudos de prevenção ou tratamento de doenças associadas com o estresse oxidativo (BALASUBRAMANYAM et al., 2003; COLE; TETER; FRAUTSCHY, 2007; SUBRAMANIAN et al., 1994). Neste estudo, foi realizada uma comparação entre os efeitos e mecanismos antigenotóxicos da curcumina DS e padrão, avaliando os danos ao DNA induzidos pela cisplatina em ratos Wistar pelo teste do micronúcleo e ensaio do cometa.

As doses utilizadas nesta pesquisa foram escolhidas levando-se em consideração dados previamente publicadas, em que a curcumina apresentou atividade biológica em uma ampla faixa de doses. Abraham, Sarma e Kesavan (1993) demonstraram que a curcumina nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg m.c., em administração única em camundongos, reduziu a formação de micronúcleos, nos eritrócitos da medula óssea, induzidos pela radiação gama. A curcumina na dose de 80 mg/kg m.c., associada ou não com a piperina, também reduziu a formação de micronúcleos nos eritrócitos da medula óssea induzidos pelo 7,12-dimetilbenz[a]antraceno em hamsters (BALAKRISHNAN et al., 2008).

Em um estudo de toxicidade aguda e subaguda em ratos com a curcumina formulada em nanopartículas, na dose de 2000 mg/kg m.c., não foram observados sinais de toxicidade nos parâmetros hematológicos, bioquímicos ou histológicos avaliados. A curcumina nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg m.c. não apresentou efeitos genotóxicos na avaliação de aberrações cromossômicas, formação de micronúcleos e no ensaio do cometa (DANDEKAR et al., 2010).

Assim, foram avaliados os efeitos do pré-tratamento com 4 administrações de curcumina DS nas doses de 5, 25 e 50 mg/kg m.c. e a curcumina padrão na dose de 50 mg/kg m.c.. A dose de cisplatina (6 mg/kg m.c.) utilizada foi estabelecida com base nos estudos previamente realizados pelo nosso grupo de pesquisa (ANTUNES et al., 2000; SERPELONI et al., 2010).

Em experimentos de avaliação toxicológica, a determinação de alterações na massa total do animal e a relação da massa dos órgãos e a massa total do animal pode ser utilizada como indicativo de toxicidade do composto avaliado, assim como identificação de órgãos alvo. Uma alteração desproporcional na massa de um órgão,

de maneira geral, é um indicativo de efeito tóxico naquele órgão (WOLFSEGGGER et al., 2009). Nos animais tratados apenas com a curcumina não houve diferença na massa total em relação ao controle negativo. Entretanto, foi observada uma redução significativa na massa dos ratos tratados com a cisplatina em relação ao controle negativo. Também pode ser observado que o pré-tratamento com a curcumina não alterou a perda de massa induzida pela cisplatina e que não houve diferença na massa relativa do rim no tratamento com a curcumina, cisplatina ou a combinação dos dois.

A avaliação dos danos ao DNA foi realizada pelo teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea e pelo ensaio do cometa nos rins e no sangue periférico. Estes dois ensaios são atualmente utilizados em combinação para avaliação dos efeitos genotóxicos de agentes físicos ou químicos. No teste do micronúcleo podem ser detectadas quebras e perdas cromossômicas. No ensaio do cometa são detectadas lesões iniciais no DNA passíveis de reparo. O uso destes dois ensaios em conjunto é importante, pois os seus resultados são complementares agregando informações sobre o mecanismo de indução dos danos (BOWEN et al., 2011).

A relação entre PCE e NCE foi avaliada com o teste do micronúcleo para verificar a toxicidade nas células da medula óssea. A diminuição no número de PCE indica a citotoxicidade neste tecido (VENKATESH et al., 2007). Nos nossos resultados, em qualquer dos tratamentos realizados, não foi observada citotoxicidade na medula óssea.

Estudos mostram que a cisplatina induz instabilidade cromossômica, o que pode ser observado pela indução de micronúcleos *in vitro* e *in vivo* (ARJUMAND; SULTANA, 2011; SANTOS et al., 2012). No nosso estudo, também foi observado o aumento da frequência de micronúcleos em células da medula óssea de ratos expostos a cisplatina. No teste do micronúcleo, os resultados mostraram que a curcumina DS e padrão, nas doses avaliadas, não induziram a formação de micronúcleos. Nos tratamentos em associação, a curcumina DS e padrão, em todas as doses avaliadas, reduziram a formação de micronúcleos induzida pela cisplatina.

No ensaio do cometa, a instabilidade cromossômica induzida pela cisplatina pôde ser observada pela redução da migração do DNA no gel de agarose. As lesões ao DNA detectadas pelo ensaio do cometa são as quebras de fita simples, quebras de fita duplas, sítios alkali lábeis, *crosslinks* DNA-DNA e DNA-proteína. As quebras de fita simples, quebras de fita duplas e os sítios alkali lábeis são identificados no

ensaio do cometa como um aumento na migração do DNA do nucleóide no gel de agarose, formando uma imagem semelhante a de um cometa com cabeça e cauda, enquanto os *crosslinks* DNA-DNA e DNA-proteína diminuem a migração do DNA do nucleóide no gel (NESSLANY et al., 2007).

O principal efeito conhecido da cisplatina no DNA é formação de *crosslinks*, o que pode ser observado pela redução na porcentagem de DNA na cauda dos nucleóides de células do tecido renal, nos animais tratados com cisplatina (STANG; WITTE, 2009). A cisplatina liga-se à molécula de DNA resultando em *crosslinks*, o que é considerado o seu principal mecanismo de citotoxicidade em células tumorais (WANG; REED; LI, 2004).

Nos estudos de genotoxicidade com o ensaio do cometa é frequentemente utilizado um tempo de 3 a 6 horas de exposição dos animais aos agentes testados. Entretanto, a formação de *crosslinks* pela cisplatina pode ser determinada até 24 horas após a exposição. Nessler et al. (2007) avaliaram o efeito genotóxico da cisplatina nos rins de ratos Sprague–Dawley tratados com a cisplatina nas doses de 5 ou 10 mg/kg m.c. intraperitonealmente, observando a redução do parâmetro *Olive tail moment*, 3 ou 22 horas após a administração da cisplatina. Serpeloni et al. (2010) e Wozniak, Czechowska e Blasiak (2004) observaram que a associação de antioxidantes à cisplatina aumentou a migração do DNA no ensaio do cometa. Nos nossos resultados, a curcumina DS e padrão não apresentaram efeito significativo nos danos ao DNA induzidos pela cisplatina nos rins.

Os efeitos da curcumina DS e padrão na genotoxicidade da cisplatina nos ratos Wistar foram comparáveis aos observados nas células PC12. Nas células PC12, a cisplatina induziu a formação de micronúcleos e reduziu a migração do DNA no ensaio do cometa. A curcumina reduziu a formação de micronúcleos, mas no ensaio do cometa não alterou a redução da migração do DNA induzida pela cisplatina (MENDONÇA et al., 2009; MENDONÇA et al., 2010). Estes resultados sugerem que o mecanismo de antígeno toxicidade da curcumina não está relacionado com redução da formação de *crosslinks*, uma vez que a curcumina reduziu a formação de micronúcleos, porém não interferiu na redução da migração do DNA induzido pela cisplatina no ensaio do cometa.

Várias pesquisas têm demonstrado a relevância do estresse oxidativo nos danos celulares induzidos pela cisplatina. O estresse oxidativo pode causar danos ao DNA, produzindo quebras de fita, alteração da expressão gênica e mutações

(ARJUMAND; SULTANA, 2011). Os efeitos protetores da curcumina, assim como a sua antigenotoxicidade, são frequentemente relacionados com suas propriedades antioxidantes. Alguns agentes quimiopreventivos podem exercer seus efeitos protetores reduzindo os efeitos dos compostos genotóxicos, aumentando a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante celular, ou pela ação direta no sequestro de espécies reativas (AK; GULCIN, 2008; COSTA; BADAWI; EL-SOHEMY, 2012; LEE et al., 2010).

Neste estudo, os parâmetros de estresse oxidativo avaliados foram a concentração de GSH e a formação de TBARS no tecido renal. Em geral, é aceito que o mecanismo pelo qual a cisplatina induz estresse oxidativo no tecido renal envolve a depleção da GSH e a indução da peroxidação lipídica (MA et al., 2007; OGNJANOVIC et al., 2012). A GSH é um tripeptídeo encontrado intracelularmente em altas concentrações, que possui um papel fundamental na biotransformação e eliminação de xenobióticos, além da defesa das células sobre o estresse oxidativo. As propriedades químicas do grupo sulfidríla da GSH promovem uma proteção sobre as espécies reativas de oxigênio e compostos gerados em processos oxidativos (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). O aumento de TBARS, que incluem o malondialdeído, é um indicador da peroxidação lipídica que pode ser iniciada pelas espécies reativas de oxigênio. A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas das células resulta na formação de compostos eletrófilos, sendo alguns deles genotóxicos (MARNETT; RIGGINS; WEST, 2003; POTTER; NEUN; STERN, 2011).

Nakai et al. (2011) demonstraram que a GSH diminui a formação de *crosslinks* platina-DNA, sugerindo a formação de um complexo GSH-cDDP como responsável por este efeito. A formação de conjugados GSH/xenobióticos é um conhecido mecanismo de detoxificação celular do organismo. Uma vez formados, os conjugados GSH/xenobióticos são eliminados da célula, o que pode explicar a depleção da GSH no tecido renal. Como a oxidação da GSH à glutathiona dissulfeto (GSSH) é um importante mecanismo de defesa sobre as espécies reativas de oxigênio, a depleção da concentração intracelular de GSH pode contribuir significativamente na indução do estresse oxidativo pela cisplatina no tecido renal (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

Na literatura, o tempo necessário para a indução da nefrotoxicidade pela cisplatina em roedores varia entre um a sete dias após a sua administração. Em

camundongos tratados com a cisplatina na dose de 6 mg/mL, após 24 horas de exposição, foi obtida uma significativa redução na concentração celular de GSH e aumento das TBARS no tecido renal (SERPELONI et al., 2011). Em ratos Wistar, sete dias após a administração da cisplatina, foi observada a depleção da GSH, aumento das TBARS e diminuição do *clearance* de creatinina (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 2000).

As propriedades antioxidantes da curcumina envolvem a capacidade de modulação da concentração da GSH (BISWAS et al., 2005). No tecido cardíaco de ratos Wistar, a curcumina aumentou a concentração de GSH reduzindo o estresse oxidativo induzido pela doxorrubicina (SWAMY et al., 2012). Na linhagem HEK 293 de células humanas embrionárias de rim, a curcumina reverteu significativamente a depleção de GSH induzida pela cisplatina (WALY; AL MOUNDHRI; ALI, 2011). Estes dados sugerem que a curcumina poderia ser útil na redução da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina. Entretanto, nos nossos resultados não foi possível observar uma significativa depleção da GSH e indução da peroxidação lipídica no tecido renal. Dessa forma, não foi possível observar efeitos protetores da curcumina nesses parâmetros.

No nosso estudo, o tempo de 24 horas após a administração da cisplatina pode não ter sido suficiente para ocorrer a depleção da GSH e indução da peroxidação lipídica no tecido renal. Al-Majed et al. (2003) avaliaram a progressão da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos Wistar, de um a sete dias após sua administração, e mostraram que as maiores alterações na função renal ocorreram no quinto dia. Neste mesmo estudo, o pico na depleção da GSH foi observado 48 horas após a administração da cisplatina, enquanto a peroxidação lipídica aumentou progressivamente até o quinto dia.

A utilização de antioxidantes como agentes citoprotetores tem sido objeto de controvérsias, devido ao possível efeito de redução da citotoxicidade dos quimioterápicos em células tumorais (PRASAD, 2004). Agentes que atuam inibindo a função da p53 podem contribuir para a resistência das células tumorais aos quimioterápicos. As funções da p53 incluem a parada no ciclo celular ou apoptose em resposta aos sinais de danos ao DNA. A perda da função da p53 pode atenuar a resposta à sinalização de danos ao DNA, e consequente reduzir a apoptose (KESHELAVA et al., 2001; MEEK, 2009). Por esta razão, avaliamos a influência da

curcumina na modulação da transcrição do RNAm da p53 nas células PC12 e no tecido renal.

A formação de aductos platina-DNA pela cisplatina é o seu principal mecanismo de indução de danos ao DNA, consequente ativando a p53 e induzindo apoptose em células tumorais (PABLA et al., 2008). Entretanto, estudos *in vitro* e *in vivo* também indicam a participação da p53 na toxicidade da cisplatina em células normais, como ocorre na nefrotoxicidade. Após a administração da cisplatina foi observado um acúmulo da p53 no núcleo das células do córtex renal, ativando a caspase-3 e resultando em apoptose. A inibição da p53 pela pitifrina- α reduziu parcialmente a ativação da caspase-3, a apoptose e os danos renais, sugerindo que a p53 tem um papel fundamental na apoptose induzida pela cisplatina nas células dos túbulos renais (JIANG; DONG, 2008).

A importância da p53 na nefrotoxicidade sugere que inibidores da p53 poderiam reduzir a apoptose das células dos túbulos renais, prevenindo os danos aos rins. Entretanto, como em muitos tipos de cânceres a apoptose induzida pela cisplatina em células cancerosas depende da ativação da p53, os inibidores da p53 poderiam interferir na eficácia antitumoral da cisplatina (AHMAD, 2010; JIANG; DONG, 2008).

Nos nossos resultados, o tratamento dos animais com a curcumina DS ou padrão não suprimiu a transcrição do RNAm da p53 no tecido renal. A cisplatina não aumentou significativamente a expressão do gene *Tp53* nos rins, entretanto, no tratamento associando a curcumina DS ou padrão à cisplatina, a expressão do gene *Tp53* foi maior do que nos animais do grupo controle negativo. Em um estudo *in vitro* em células de músculo liso vascular da aorta de ratos foi observado que a curcumina nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M não alteraram significativamente a transcrição do RNAm da p53 avaliado por RT-PCR e *Northern blotting* (CHEN; HUANG, 1998). Nas células de sarcoma de Ewing humano a curcumina aumentou, significativamente e de maneira dose-dependente, a sensibilidade das células tumorais à radiação ionizante. Este efeito foi relatado pelos autores como independente da p53, uma vez que os tratamentos com curcumina ou a curcumina associada à radiação ionizante não alteraram a concentração celular de RNAm da p53 (VEERARAGHAVAN et al., 2010).

Resumindo, os resultados dos experimentos *in vivo* indicam que a maior solubilidade em água contribui para o aumento da biodisponibilidade da curcumina,

uma vez que foi demonstrado que a curcumina DS tem maior absorção gastrointestinal do que a curcumina padrão. Não foram observadas diferenças significativas entre os efeitos da curcumina DS e padrão nos parâmetros avaliados neste estudo. O efeito da curcumina DS na redução da formação de micronúcleos foi semelhante ao da curcumina padrão. As curcuminas DS e padrão não reduziram a formação de *crosslinks* cDDP-DNA no tecido renal, assim como não alteraram a concentração da GSH e TBARS e a transcrição do RNAm da p53. Em conjunto, esses resultados mostram que a incorporação da curcumina em dispersões sólidas não trouxe prejuízos aos efeitos biológicos da curcumina. Dessa forma, a otimização das propriedades físico-químicas obtidas pela curcumina DS, aumenta a sua possibilidade de utilização terapêutica.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, nas condições avaliadas, podemos concluir que:

- Na avaliação da viabilidade celular, a curcumina DS não reduziu a citotoxicidade da cisplatina em células PC12 diferenciadas;
- A curcumina DS reduziu a toxicidade da cisplatina na formação de neuritos em células PC12 expostas ao NGF;
- Os efeitos protetores da curcumina em células PC12 não são dependentes de alterações na transcrição do RNAm da proteína p53;
- A curcumina não interferiu na citotoxicidade da cisplatina em células HepG2;
- A formulação da curcumina em dispersão sólida aumentou a sua absorção no trato gastrointestinal de ratos Wistar;
- Os efeitos da curcumina DS e padrão, não apresentaram diferenças significativas nos ensaios *in vivo* de genotoxicidade, de estresse oxidativo e expressão do gene *Tp53*;
- A curcumina DS e padrão não apresentaram efeitos genotóxicos nos tecidos avaliados, e reduziram a indução de micronúcleos nas células da medula óssea;
- A curcumina DS e padrão não reduziram a formação de *crosslinks* no tecido renal;
- A curcumina DS e padrão não alteraram significativamente as concentrações de GSH e TBARS nos rins;
- A curcumina DS e padrão não diminuíram a transcrição do RNAm da p53 nas células PC12 e no tecido renal.

A redução da toxicidade da cisplatina, assim como a sua neurotoxicidade e genotoxicidade, possibilitaria um tratamento quimioterápico mais intenso e eficaz. Nossos resultados sugerem que os efeitos protetores da curcumina poderiam ser seletivos a células normais, não reduzindo os efeitos da cisplatina em células tumorais. A formulação da curcumina na dispersão sólida avaliada, não reduz suas propriedades protetoras, e aumentou sua biodisponibilidade em ratos Wistar.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, S. K.; SARMA, L.; KESAVAN, P. C. Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and beta-carotene against gamma-radiation-induced in vivo chromosomal damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 303, n. 3, p. 109-112, 1993.

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 40-59, 2009.

AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, Athens, v. 23, n. 1A, p. 363-398, 2003.

AHMAD, S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 7, n. 3, p. 543-566, 2010.

AK, T.; GULCIN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-biological Interactions**, Amsterdam, v. 174, n. 1, p. 27-37, 2008.

AL-MAJED, A. A., et al. Effect of oral administration of Arabic gum on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, New York, v. 17, n. 3, p. 146-153, 2003.

ALAM, S.; PANDA, J. J.; CHAUHAN, V. S. Novel dipeptide nanoparticles for effective curcumin delivery. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 7, p. 4207-4221, 2012.

ALBERS, J. W., et al. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, n. 2, 2011.

ALI, B. H.; AL MOUNDHRI, M. S. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, n. 8, p. 1173-1183, 2006.

ANAND, P., et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007.

ANAND, P., et al. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 267, n. 1, p. 133-164, 2008.

ANTUNES, L. M., et al. Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 465, n. 1-2, p. 131-137, 2000.

ANTUNES, L. M.; DARIN, J. D.; BIANCHI, M. D. Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. **Pharmacological Research**, London, v. 41, n. 4, p. 405-411, 2000.

ANTUNES, L. M., et al. Effects of selenium pretreatment on cisplatin-induced chromosome aberrations in wistar rats. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, New York, v. 20, n. 6, p. 341-348, 2000.

ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13 n. 2 p. 81-88, 2000.

APPENROTH, D., et al. Protective effects of vitamin E and C on cisplatin nephrotoxicity in developing rats. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 71, n. 11, p. 677-683, 1997.

ARANY, I.; SAFIRSTEIN, R. L. Cisplatin nephrotoxicity. **Seminars in Nephrology**, New York, v. 23, n. 5, p. 460-464, 2003.

ARAUJO, C. C.; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 5, p. 723-728, 2001.

ARGYRIOU, A. A., et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 82, n. 1, p. 51-77, 2012.

ARJUMAND, W.; SULTANA, S. Glycyrrhizic acid: a phytochemical with a protective role against cisplatin-induced genotoxicity and nephrotoxicity. **Life Sciences**, Oxford, v. 89, n. 13-14, p. 422-429, 2011.

ARMSTRONG, D. K., et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 354, n. 1, p. 34-43, 2006.

ATTIA, S. M. The impact of quercetin on cisplatin-induced clastogenesis and apoptosis in murine marrow cells. **Mutagenesis**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 281-288, 2010.

BALAKRISHNAN, S., et al. Antigenotoxic Effects of Curcumin and Piperine Alone or in Combination Against 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene Induced Genotoxicity in Bone Marrow of Golden Syrian Hamsters. **Toxicology Mechanisms and Methods**, London, v. 18, n. 9, p. 691-696, 2008.

BALASUBRAMANYAM, M., et al. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 28, n. 6, p. 715-721, 2003.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery From Medicinal Plants. **Life Sciences**, Oxford, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BHANA, S.; LLOYD, D. R. The role of p53 in DNA damage-mediated cytotoxicity overrides its ability to regulate nucleotide excision repair in human fibroblasts. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 43-50, 2008.

BISHT, S., et al. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 5, p. 1-18, 2007.

BISWAS, S. K., et al. Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 7, n. 1-2, p. 32-41, 2005.

BLOCK, K. I., et al. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. **Cancer Treatment Reviews**, London, v. 33, n. 5, p. 407-418, 2007.

BONASSI, S., et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 93-100, 2011.

BOWEN, D. E., et al. Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 722, n. 1, p. 7-19, 2011.

BRAGADO, P., et al. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. **Apoptosis**, London, v. 12, n. 9, p. 1733-1742, 2007.

BROZOVIC, A.; AMBRIOVIC-RISTOV, A.; OSMAK, M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 40, n. 4, p. 347-359, 2010.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.

CASARES, C., et al. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. **European Archives of Oto-rhino-laryngology**, Heidelberg, 2012. In press.

CEPEDA, V., et al. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 3-18, 2007.

CHANG, T. C., et al. Randomized trial of neoadjuvant cisplatin, vincristine, bleomycin, and radical hysterectomy versus radiation therapy for bulky stage IB and IIA cervical cancer. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 18, n. 8, p. 1740-1747, 2000.

CHEN, H. W.; HUANG, H. C. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 124, n. 6, p. 1029-1040, 1998.

CHENG, A. L., et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Research**, Athens, v. 21, n. 4B, p. 2895-2900, 2001.

COLE, G. M.; TETER, B.; FRAUTSCHY, S. A. Neuroprotective effects of curcumin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 595, p. 197-212, 2007.

CONKLIN, K. A. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 37, n. 1, p. 1-18, 2000.

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 3, n. 4, p. 294-300, 2004.

COSTA, L. A.; BADAWI, A.; EL-SOHEMY, A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. **Annals of Nutrition & Metabolism**, Basel, v. 60, p. 27-36, 2012.

DANDEKAR, P., et al. Toxicological evaluation of pH-sensitive nanoparticles of curcumin: acute, sub-acute and genotoxicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 8-9, p. 2073-2089, 2010.

DANNENFELSER, R. M., et al. Development of clinical dosage forms for a poorly water soluble drug I: Application of polyethylene glycol-polysorbate 80 solid dispersion carrier system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 93, n. 5, p. 1165-1175, 2004.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, Baltimore, v. 55, n. 11, p. 396-398, 1997.

DHILLON, N., et al. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 14, n. 14, p. 4491-4499, 2008.

DIWAN, B. A., et al. Transplacental carcinogenesis by cisplatin in F344/NCr rats: promotion of kidney tumors by postnatal administration of sodium barbital. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 132, n. 1, p. 115-121, 1995.

DO AMARAL, C. L., et al. Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 82, n. 6, p. 363-370, 2008.

DUVOIX, A., et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 223, n. 2, p. 181-190, 2005.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FILHO, A. B. C., et al. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 171-177, 2000.

FLOREA, A.; BUSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. **Canceres**, Basel, v. 3, p. 1351-1371, 2011.

GARTLON, J., et al. Evaluation of a proposed in vitro test strategy using neuronal and non-neuronal cell systems for detecting neurotoxicity. **Toxicol In Vitro**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 1569-1581, 2006.

GELDOF, A. A. Nerve-growth-factor-dependent neurite outgrowth assay; a research model for chemotherapy-induced neuropathy. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 121, n. 11, p. 657-660, 1995.

GO, R. S.; ADJEI, A. A. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 17, n. 1, p. 409-422, 1999.

GOEL, A.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. **Nutrition and cancer**, London, v. 62, n. 7, p. 919-930, 2010.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 73, n. 7, p. 2424-2428, 1976.

GREENE, M. H. Is cisplatin a human carcinogen? **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 84, n. 5, p. 306-312, 1992.

GREGG, R. W., et al. Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 10, n. 5, p. 795-803, 1992.

GUPTA, S. C., et al. Multitargeting by turmeric, the golden spice: From kitchen to clinic. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, 2012. In press.

GUTIERREZ-GUTIERREZ, G., et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: clinical features, diagnosis, prevention and treatment strategies. **Clinical & Translational Oncology**, Barcelona, v. 12, n. 2, p. 81-91, 2010.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs & Aging**, Auckland, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HSU, C. H.; CHENG, A. L. Clinical studies with curcumin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 595, p. 471-480, 2007.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

IRESON, C. R., et al. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v. 11, n. 1, p. 105-111, 2002.

JAGGI, A. S.; SINGH, N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. **Toxicology**, Amsterdam, v. 291, n. 1-3, p. 1-9, 2012.

JIANG, M.; DONG, Z. Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 327, n. 2, p. 300-307, 2008.

JIANG, M., et al. Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 73, n. 9, p. 1499-1510, 2007.

JIANG, Y., et al. Implications of apurinic/aprimidinic endonuclease in reactive oxygen signaling response after cisplatin treatment of dorsal root ganglion neurons. **Cancer research**, Chicago, v. 68, n. 15, p. 6425-6434, 2008.

KASPARKOVA, J.; CHVALOVA, K.; BRABEC, V. Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 1812-1821, 2007.

KAWANO, Y., et al. Caffeine increases the antitumor effect of Cisplatin in human hepatocellular carcinoma cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 35, n. 3, p. 400-407, 2012.

KELSEY, N. A.; WILKINS, H. M.; LINSEMAN, D. A. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 11, p. 7792-7814, 2010.

KESHELAVA, N., et al. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. **Cancer Research**, Chicago, v. 61, n. 16, p. 6185-6193, 2001.

KING, M. D., et al. Attenuation of hematoma size and neurological injury with curcumin following intracerebral hemorrhage in mice. **Journal of Neurosurgery**, Charlottesville, v. 115, n. 1, p. 116-123, 2011.

KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21st century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 53, n. 2, p. 135-148, 2001.

KLEIN, R.; BROWN, D.; TURNLEY, A. M. Phenoxodiol protects against Cisplatin induced neurite toxicity in a PC-12 cell model. **BMC Neuroscience**, London, v. 8, p. 1-7, 2007.

KOSMIDER, B., et al. Evaluation of the genotoxicity of cis-bis(3-aminoflavone)dichloroplatinum(II) in comparison with cis-DDP. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 558, n. 1-2, p. 93-110, 2004.

KOSMIDER, B., et al. Evaluation of P53 and BAX gene expression and induction of apoptosis and necrosis by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-diamminedichloroplatinum(II) (cis-DDP) in human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 604, n. 1-2, p. 28-35, 2006.

KRUSE, J. P.; GU, W. Modes of p53 regulation. **Cell**, Cambridge, v. 137, n. 4, p. 609-622, 2009.

KULKARNI, S. K.; DHIR, A. An overview of curcumin in neurological disorders. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Bombay, v. 72, n. 2, p. 149-154, 2010.

KUNNUMAKKARA, A. B.; ANAND, P.; AGGARWAL, B. B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. **Cancer Letters**, Limerick, v. 269, n. 2, p. 199-225, 2008.

LAO, C. D., et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 6, p. 1-4, 2006.

LAWENDA, B. D., et al. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 100, n. 11, p. 773-783, 2008.

LEE, J. C., et al. Dietary curcumin increases antioxidant defenses in lung, ameliorates radiation-induced pulmonary fibrosis, and improves survival in mice. **Radiation Research**, Charlottesville, v. 173, n. 5, p. 590-601, 2010.

LEE, J. O., et al. Combination chemotherapy with capecitabine and cisplatin for patients with metastatic hepatocellular carcinoma. **Annals of Oncology**, Boston, v. 20, n. 8, p. 1402-1407, 2009.

LEUNG, T. W., et al. Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 5, n. 7, p. 1676-1681, 1999.

LI, L.; BRAITEH, F. S.; KURZROCK, R. Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. **Cancer**, Hoboken, v. 104, n. 6, p. 1322-1331, 2005.

LI, X.; SONG, Q.; CHEN, B. Study on the antimutagenicity of curcumin. **Journal of Hygiene Research**, Beijing, v. 27, n. 4, p. 263-265, 1998.

LIN, S. S., et al. Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 285, n. 2, p. 127-133, 2009.

LIU, E., et al. Curcumin induces G2/M cell cycle arrest in a p53-dependent manner and upregulates ING4 expression in human glioma. **Journal of Neuro-oncology**, Boston, v. 85, n. 3, p. 263-270, 2007.

LIU, W., et al. Curcumin attenuates peroxynitrite-induced neurotoxicity in spiral ganglion neurons. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 150-157, 2011.

MA, S. F., et al. Combining cisplatin with cationized catalase decreases nephrotoxicity while improving antitumor activity. **Kidney International**, New York, v. 72, n. 12, p. 1474-1482, 2007.

MADDOCKS, O. D.; VOUSDEN, K. H. Metabolic regulation by p53. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 89, n. 3, p. 237-245, 2011.

MAHESHWARI, R. K., et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life Sciences**, Oxford, v. 78, n. 18, p. 2081-2087, 2006.

MALIAKEL, D. M.; KAGIYA, T. V.; NAIR, C. K. Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and alpha-tocopherol. **Experimental and Toxicologic Pathology** New York, v. 60, n. 6, p. 521-527, 2008.

MARCZYLO, T. H., et al. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v. 60, n. 2, p. 171-177, 2007.

MARNETT, L. J.; RIGGINS, J. N.; WEST, J. D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 111, n. 5, p. 583-593, 2003.

MASUDA, H.; TANAKA, T.; TAKAHAMA, U. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 203, n. 2, p. 1175-1180, 1994.

MEEK, D. W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? **Nature Reviews. Cancer**, London, v. 9, n. 10, p. 714-723, 2009.

MEHUYS, E., et al. Human bioavailability of propranolol from a matrix-in-cylinder system with a HPMC-Gelucire core. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 523-536, 2005.

MENDONÇA, L. M., et al. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. **Mutation research**, Amsterdam, v. 675, n. 1-2, p. 29-34, 2009.

MENDONÇA, L. M., et al. Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. **Human & Experimental Toxicology**, London, v. 29, n. 8, p. 635-643, 2010.

MIDDLETON, E., JR.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MORGAN, K. P.; BUIE, L. W.; SAVAGE, S. W. The role of mannitol as a nephroprotectant in patients receiving cisplatin therapy. **The Annals of Pharmacotherapy**, Cincinnati, v. 46, n. 2, p. 276-281, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSS, R. W. Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants? **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 5, n. 1, p. 63-82, 2006.

NAKAI, T., et al. Modulation of oxidative DNA damage and DNA-crosslink formation induced by cis-diammine-tetrachloro-platinum(IV) in the presence of endogenous reductants. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 105, n. 1, p. 1-5, 2011.

NESSLANY, F., et al. *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 630, n. 1-2, p. 28-41, 2007.

NING, L., et al. Down-regulation of Notch1 signaling inhibits tumor growth in human hepatocellular carcinoma. **American Journal of Translational Research**, Madison, v. 1, n. 4, p. 358-366, 2009.

NOTARBARTOLO, M., et al. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 224, n. 1, p. 53-65, 2005.

OGNJANOVIC, B. I., et al. Lipid peroxidative damage on Cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: a possible protective effect of selenium. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 2, p. 1790-1803, 2012.

OLIVEIRA, R. J., et al. Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and the micronucleus assay in mice's peripheral blood. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 120-124, 2009.

PABLA, N., et al. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 10, p. 6572-6583, 2008.

PACE, A., et al. Vitamin E neuroprotection for cisplatin neuropathy A randomized, placebo-controlled trial. **Neurology**, Minneapolis, v. 74, n. 9, p. 762-766, 2010.

PAN, M. H.; HUANG, T. M.; LIN, J. K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 27, n. 4, p. 486-494, 1999.

PARACHIKOVA, A., et al. Formulation of a medical food cocktail for Alzheimer's disease: beneficial effects on cognition and neuropathology in a mouse model of the disease. **Public Library of Science One**, San Francisco, v. 5, n. 11, p. 1-8, 2010.

PARK, S. Y., et al. Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 8, p. 2881-2887, 2008.

POTTER, T. M.; NEUN, B. W.; STERN, S. T. Assay to detect lipid peroxidation upon exposure to nanoparticles. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 697, p. 181-189, 2011.

PRASAD, K. N. Multiple dietary antioxidants enhance the efficacy of standard and experimental cancer therapies and decrease their toxicity. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 3, n. 4, p. 310-322, 2004.

PREMKUMAR, K., et al. Interactive effects of saffron with garlic and curcumin against cyclophosphamide induced genotoxicity in mice. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 13, n. 3, p. 292-294, 2004.

RAJESWARAN, A., et al. Efficacy and side effects of cisplatin- and carboplatin-based doublet chemotherapeutic regimens versus non-platinum-based doublet chemotherapeutic regimens as first line treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. **Lung Cancer**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 1-11, 2008.

RAJESWARI, A. Curcumin protects mouse brain from oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 10, n. 4, p. 157-161, 2006.

RAVI, R.; SOMANI, S. M.; RYBAK, L. P. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. **Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 76, n. 6, p. 386-394, 1995.

REDDY, A. C.; LOKESH, B. R. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 111, n. 1-2, p. 117-124, 1992.

RJIBA-TOUATI, K., et al. Induction of DNA fragmentation, chromosome aberrations and micronuclei by cisplatin in rat bone-marrow cells: Protective effect of recombinant human erythropoietin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 747, n. 2, p. 202-206, 2012.

ROSENBERG, B. Fundamental studies with cisplatin. **Cancer**, New York, v. 55, n. 10, p. 2303-2306, 1985.

RYBAK, L. P., et al. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, Sendai, v. 219, n. 3, p. 177-186, 2009.

SAKAI, Y., et al. Rapid and sensitive neurotoxicity test based on the morphological changes of PC12 cells with simple computer-assisted image analysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 90, n. 1, p. 20-24, 2000.

SALAZAR, A. M.; SORDO, M.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Relationship between micronuclei formation and p53 induction. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 672, n. 2, p. 124-128, 2009.

SANCHEZ-GONZALEZ, P. D., et al. An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 41, n. 10, p. 803-821, 2011.

SANDUR, S. K., et al. Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF-kappaB activity. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, New York, v. 75, n. 2, p. 534-542, 2009.

SANTOS, G. C., et al. Protective effect of bixin on cisplatin-induced genotoxicity in PC12 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 335-340, 2012.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SELVAKUMAR, E., et al. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. **Toxicology**, Amsterdam, v. 217, n. 1, p. 71-78, 2006.

SERPELONI, J. M., et al. An evaluation, using the comet assay and the micronucleus test, of the antigenotoxic effects of chlorophyll b in mice. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 725, n. 1-2, p. 50-56, 2011.

SERPELONI, J. M., et al. Lutein improves antioxidant defense in vivo and protects against DNA damage and chromosome instability induced by cisplatin. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 84, n. 10, p. 811-822, 2010.

SHAH, N.; DIZON, D. S. New-generation platinum agents for solid tumors. **Future Oncology**, London, v. 5, n. 1, p. 33-42, 2009.

SHAIKH, J., et al. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 37, n. 3-4, p. 223-230, 2009.

SHARMA, R. A., et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 10, n. 20, p. 6847-6854, 2004.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: the story so far. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 41, n. 13, p. 1955-1968, 2005.

SHARMA, R. A.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 595, p. 453-470, 2007.

SHI, H. S., et al. A systemic administration of liposomal curcumin inhibits radiation pneumonitis and sensitizes lung carcinoma to radiation. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 7, p. 2601-2611, 2012.

SHIMOKE, K.; SASAYA, H.; IKEUCHI, T. Analysis of the role of nerve growth factor in promoting cell survival during endoplasmic reticulum stress in PC12 cells. **Methods in Enzymology**, New York, v. 490, p. 53-70, 2011.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, n. 47, p. 7265-7279, 2003.

SINGH, N. P., et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SINGH, U., et al. Reactions of reactive oxygen species (ROS) with curcumin analogues: Structure-activity relationship. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 45, n. 3, p. 317-325, 2011.

SOOBRAATTEE, M. A., et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 579, n. 1-2, p. 200-213, 2005.

SOUNG, Y. H.; CHUNG, J. Curcumin inhibition of the functional interaction between integrin $\alpha 6 \beta 4$ and the epidermal growth factor receptor. **Molecular Cancer Therapeutics**, Philadelphia, v. 10, n. 5, p. 883-891, 2011.

SREEJAYAN; RAO, M. N. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 46, n. 12, p. 1013-1016, 1994.

STANG, A.; WITTE, I. Performance of the comet assay in a high-throughput version. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 675, n. 1-2, p. 5-10, 2009.

STATHOPOULOS, G. P. Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation. **Anti-cancer Drugs**, Oxford, v. 21, n. 8, p. 732-736, 2010.

SUBRAMANIAN, M., et al. Diminution of singlet oxygen-induced DNA damage by curcumin and related antioxidants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 311, n. 2, p. 249-255, 1994.

SUKUMARI-RAMESH, S., et al. Dietary phytochemicals induce p53- and caspase-independent cell death in human neuroblastoma cells. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Oxford, v. 29, n. 7, p. 701-710, 2011.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews. Cancer**, London, v. 3, n. 10, p. 768-780, 2003.

SURRALLS, J., et al. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 341, n. 3, p. 169-184, 1995.

SWAMY, A. V., et al. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. **Indian Journal of Pharmacology**, Mumbai, v. 44, n. 1, p. 73-77, 2012.

TICE, R. R., et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TISCHLER, A. S.; GREENE, L. A. Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, Baltimore, v. 39, n. 2, p. 77-89, 1978.

TITENKO-HOLLAND, N., et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 388, n. 1, p. 85-95, 1997.

TODD, R. C.; LIPPARD, S. J. Consequences of cisplatin binding on nucleosome structure and dynamics. **Chemistry & Biology**, London, v. 17, n. 12, p. 1334-1343, 2010.

TSANG, R. Y.; AL-FAYEA, T.; AU, H. J. Cisplatin overdose: toxicities and management. **Drug Safety**, Auckland, v. 32, n. 12, p. 1109-1122, 2009.

TSAO, A. S.; KIM, E. S.; HONG, W. K. Chemoprevention of cancer. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, New York, v. 54, n. 3, p. 150-180, 2004.

VALLE, J., et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 362, n. 14, p. 1273-1281, 2010.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 12, n. 23-24, p. 1068-1075, 2007.

VEERARAGHAVAN, J., et al. Curcumin-altered p53-response genes regulate radiosensitivity in p53-mutant Ewing's sarcoma cells. **Anticancer Research**, Athens, v. 30, n. 10, p. 4007-4015, 2010.

VENKATESH, P., et al. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: A micronucleus study. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 6, n. 1, p. 42-53, 2007.

VERSTAPPEN, C. C., et al. Amifostine protects against chemotherapy-induced neurotoxicity: an in vitro investigation. **Anticancer Research**, Athens, v. 24, n. 4, p. 2337-2341, 2004.

WAALKES, M. P., et al. Hypersusceptibility to cisplatin carcinogenicity in metallothionein-I/II double knockout mice: production of hepatocellular carcinoma at clinically relevant doses. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 119, n. 1, p. 28-32, 2006.

WAHLSTROM, B.; BLENNOW, G. A study on the fate of curcumin in the rat. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, Copenhagen, v. 43, n. 2, p. 86-92, 1978.

WALY, M. I.; AL MOUNDHRI, M. S.; ALI, B. H. Effect of curcumin on cisplatin- and oxaliplatin-induced oxidative stress in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. **Renal Failure**, New York, v. 33, n. 5, p. 518-523, 2011.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v. 4, n. 4, p. 307-320, 2005.

WANG, G. D.; REED, E.; LI, Q. Q. Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review). **Oncology Reports**, Athens, v. 12, n. 5, p. 955-965, 2004.

WANG, M. S., et al. Curcumin reduces alpha-synuclein induced cytotoxicity in Parkinson's disease cell model. **BMC Neuroscience**, London, v. 11, p. 1-10, 2010.

WANG, Y., et al. A novel synthetic mono-carbonyl analogue of aurocurcumin, A13, exhibits anti-inflammatory effects in vivo by inhibition of inflammatory mediators. **Inflammation**, New York, 2011.

WEIJL, N. I., et al. Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 40, n. 11, p. 1713-1723, 2004.

WEIR, N. M., et al. Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and p38 MAPK. **Cancer Biology & Therapy**, Georgetown, v. 6, n. 2, p. 178-184, 2007.

WEISS, R. B.; CHRISTIAN, M. C. New cisplatin analogues in development. A review. **Drugs**, New York, v. 46, n. 3, p. 360-377, 1993.

WHITTAKER, J., et al. The interaction of DNA-targeted platinum phenanthridinium complexes with DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 26, n. 17, p. 3933-3939, 1998.

WILKEN, R., et al. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. **Molecular Cancer**, London, v. 10, p. 1-19, 2011.

WOLF, S., et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 44, n. 11, p. 1507-1515, 2008.

WOLFSEGGER, M. J., et al. A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 240, n. 1, p. 117-122, 2009.

WOZNIAK, K.; CZECHOWSKA, A.; BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. **Chemico-biological Interactions**, Amsterdam, v. 147, n. 3, p. 309-318, 2004.

WU, Y. J.; MULDOON, L. L.; NEUWELT, E. A. The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 312, n. 2, p. 424-431, 2005.

XIAO, Z., et al. Potential therapeutic effects of curcumin: relationship to microtubule-associated proteins 2 in Abeta1-42 insult. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1361, p. 115-123, 2010.

XIE, L.; LI, X. K.; TAKAHARA, S. Curcumin has bright prospects for the treatment of multiple sclerosis. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 323-330, 2011.

YADAV, R. S., et al. Neuroprotective effect of curcumin in arsenic-induced neurotoxicity in rats. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 533-539, 2010.

YANAGISAWA, D., et al. Curcuminoid binds to amyloid-beta1-42 oligomer and fibril. **Journal of Alzheimer's Disease**, Amsterdam, v. 24, p. 33-42, 2011.

YANG, F., et al. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 7, p. 5892-5901, 2005.

YANG, K. Y., et al. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 853, n. 1-2, p. 183-189, 2007.

YUKSEL, N., et al. Enhanced bioavailability of piroxicam using Gelucire 44/14 and labrasol: in vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** Stuttgart, v. 56, n. 3, p. 453-459, 2003.

ZANOTTO-FILHO, A., et al. The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 23, n. 6, p. 591-601, 2011.

ZHANG, L. J., et al. Tunicamycin suppresses cisplatin-induced HepG2 cell apoptosis via enhancing p53 protein nuclear export. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 327, n. 1-2, p. 171-182, 2009.

ZHANG, R.; NIU, Y.; ZHOU, Y. Increase the cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA damage in HepG2 cells by XRCC1 abrogation related mechanisms. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 192, n. 2, p. 108-114, 2010.

ZHOU, H.; BEEVERS, C. S.; HUANG, S. The targets of curcumin. **Current Drug Targets**, Hilversum, v. 12, n. 3, p. 332-347, 2011.