

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA
VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO COMPARADO DA RESPOSTA ANTITUMORAL *IN*
VITRO DA CURCUMINA, CURCUMA HOMEOPÁTICA E
MITOXANTRONA EM CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA
CANINO E HUMANO

THAYNÁ OLIVEIRA DA SILVA

Botucatu, SP
Julho de 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA
VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO COMPARADO DA RESPOSTA ANTITUMORAL *IN*
VITRO DA CURCUMINA, CURCUMA HOMEOPÁTICA E
MITOXANTRONA EM CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA
CANINO E HUMANO

THAYNÁ OLIVEIRA DA SILVA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre em Patologia
Veterinária.

Orientador: Prof^a Associada Renée
Laufer Amorim.

Coorientador: Prof^o Dr^o Carlos Eduardo
Fonseca Alves.

Botucatu, SP
Julho de 2022

S586e Silva, Thayná Oliveira da
Estudo comparado da resposta antitumoral in vitro da curcumina, curcuma homeopática e mitoxantrona em carcinoma urotelial de bexiga canino e humano / Thayná Oliveira da Silva. -- Botucatu, 2022
57 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientadora: Renée Laufer Amorim
Coorientadora: Carlos Eduardo Fonseca Alves

1. curcuma. 2. cão. 3. bexiga. 4. carcinoma. 5. mitoxantrona. I.

Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Nome do Autor: Thayná Oliveira da Silva

Título: ESTUDO COMPARADO DA RESPOSTA ANTITUMORAL *IN VITRO* DA CURCUMINA E MITOXANTRONA EM CULTURA CELULAR DE CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA CANINO E HUMANO

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Renée Laufer Amorim
Orientadora
Departamento de Patologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Drª Flávia Karina Delella
Membro
Departamento de Morfologia
IB – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Drª Fernanda Bueno Morrone
Membro
Faculdade de Farmácia
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
(PUCRS) - Porto Alegre/RS

Data da Defesa: 27 de Julho de 2022.

Dedico este trabalho a minha mãe
Elaine Cristina de Oliveira de Lima.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente a minha mãe Elaine, por me inspirar a ser guerreira e lutar pelos meus sonhos. Também ao meu padrasto Júnior, irmã Júlia e sobrinho Matheus. Obrigada família pelo amor e apoio. Amo vocês!

À minha namorada e companheira de diversas etapas do meu experimento Fernanda Zuliani. Obrigada por sempre se fazer presente nos bons e também nos piores momentos, além de todas as ajudas com o Excel. Amo você!

À minha orientadora Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, por me aceitar como parte da equipe, me ceder toda a orientação, ajuda, ensinamento e paciência durante esses dois anos. Obrigada por ter me mostrado os melhores caminhos e por confiar em mim e no meu potencial.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves pelo auxílio em tudo o que foi necessário com os experimentos, por todo conhecimento e paciência.

A todos os amigos do grupo de pesquisa, Luís Gustavo, Mayara Franzoni, Felipe Barbosa, Felipe Brasileiro, Patrícia e Antônio pela ajuda durante os experimentos e por todos os momentos de descontração que tornaram a caminhada menos árdua.

Aos residentes, pós graduandos e professores do hospital veterinário da FMVZ pela colaboração durante as coletas de amostras.

Ao Márcio Carvalho por não hesitar e sempre se dispor a realizar as extrações e experimentos. Obrigada por toda ajuda e ensinamentos com biologia molecular.

A Dr^a Camila de Paula Freitas Dell'Aqua por ter me auxiliado gentilmente com os experimentos que utilizaram a citometria de fluxo.

Aos professores do serviço de patologia veterinária: Prof^o Alexandre Hataka e Prof^a Noeme Sousa Rocha pelo incentivo, boas energias e amizade.

À psicóloga Carol Torres, por me mostrar com muito profissionalismo os melhores caminhos para tornar minha jornada pessoal e acadêmica equilibradas.

À banca examinadora pelo tempo, disponibilidade e grande contribuição para o meu trabalho.

À Prof^a Fernanda Bueno Morrone e sua pós-graduanda Liliana Rockenbach

por gentilmente enviar a linhagem tumoral humana de carcinoma urotelial de bexiga (T24).

À Prof^a Dehbora Knapp por gentilmente enviar as linhagens tumorais canina de carcinoma urotelial de bexiga (AXA, AXC e SH).

A todos os professores que colaboraram com a minha formação até aqui.

A todos os amigos que ajudaram direta ou indiretamente.

A todos os cães que participaram do início do meu projeto na tentativa de padronizar linhagens primárias de carcinoma urotelial de bexiga e meus sentimentos aos que não resistiram e faleceram por decorrência do câncer.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelos auxílios concedidos aos outros pós-graduandos e que beneficiaram meus estudos diretamente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Nunca desista, vá em frente. Sempre há uma chance de você tropeçar em algo maravilhoso.

Nunca ouvi falar em ninguém que tivesse tropeçado em algo enquanto estava sentado.”

(Charles F. Kettering)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Componentes da reação de qPCR para quantificação da expressão relativa.	26
TABELA 2- Oligonucleotídeos para amplificação de genes alvos e endógenos humanos.	26
TABELA 3- Oligonucleotídeos para amplificação de genes alvos e endógenos em cachorro.	27

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	1.	Curcuma longa	L.
(Fonte: https://ciplamasces.wordpress.com/2017/07/11/a-curcuma-ajuda-a-prevenir-o-cancer-de-prostata/).....			
			17
FIGURA 2-	Esquematização das etapas do desenvolvimento do ensaio de migração celular pelo método transwell.		29
FIGURA 3-	Efeito da curcumina na proliferação celular e valores de IC50 das linhagens K9TCC-PU AXA, AXC e SH caninas e T24 humana, após 72 horas de incubação. <i>Controle: veículo</i> . **** = $p < 0,001$ e **** = $p < 0,0001$		32
FIGURA 4-	Efeito da <i>Curcuma longa</i> D6 na proliferação celular e valores de IC50 das linhagens K9TCC-PU AXA, AXC e SH caninas e T24 humana, após 72 horas de incubação. <i>Controle: veículo</i> . * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$ e n.s = sem significância.		33
FIGURA 5-	Efeito do cloridrato de mitoxantrona (Evomixan®) na proliferação celular e valores de IC50 das linhagens K9TCC-PU AXA, AXC e SH caninas e T24 humana, após 24 horas de incubação. <i>Controle: veículo</i> . ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$		35
FIGURA 6-	Citometria de fluxo usando anexina V-FITC/PI após 72h de incubação com curcumina em células tumorais caninas AXA, AXC E SH, e T24 humana. O controle negativo (Vehicle) trata-se da utilização do DMSO na mesma concentração do tratamento. A curcumina (IC50), foi utilizada como controle positivo.		37
FIGURA 7-	Efeito da curcumina na indução de apoptose em células tumorais caninas AXA, AXC E SH, e T24 humana frente a concentração do IC50, determinadas por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/PI após 72h de incubação.....		38
FIGURA 8-	Citometria de fluxo usando anexina V-FITC/PI após 72h de incubação com cloridrato de mitoxantrona (Evomixan®) em células tumorais caninas AXA, AXC E SH. O controle negativo (Vehicle) trata-se da utilização da		

água de injeção na mesma concentração do tratamento. A mitoxantrona (IC50), foi utilizada como controle positivo..... 40

FIGURA 9- Efeito do cloridrato de mitoxantrona na indução de apoptose em células tumorais caninas AXA, AXC E SH frente a concentração do IC50, determinadas por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/PI após 24 de incubação. Quantificação da porcentagem de células vivas, apoptose recente, apoptose tardia e necrose..... 40

FIGURA 10- Ensaio de migração celular da linhagem canina de carcinoma urotelial de bexiga - SH tratadas com curcumina, curcuma D6 e cloridrato de mitoxantrona e seus respectivos veículos. ** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$ e n.s = $p > 0.05$ 41

FIGURA 11- Ensaio de migração celular da linhagem humana de carcinoma urotelial de bexiga - T24 tratadas com curcumina, curcuma D6 e cloridrato de mitoxantrona e seus respectivos veículos. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$ e n.s= $p > 0.05$ 42

FIGURA 12- Expressão gênica de Beta-integrina (B1), Beta-catenina, CDH1 (E-caderina), Vimentina, MMP2, MMP9 e TIMP-2 em células de carcinoma urotelial canino – AXA, tratadas com Mitoxantrona ou Curcuma, em comparação com células controle (só em meio de cultura) e com veículo de diluição de cada fármaco. 44

FIGURA 13- Expressão gênica de Beta-integrina (B1), Beta-catenina, CDH1 (E-caderina), Vimentina, MMP2, MMP9 e TIMP-2 em células de carcinoma urotelial canino – AXC, tratadas com mitoxantrona ou cúrcuma, em comparação com células controle (só em meio de cultura) e com veículo de diluição de cada fármaco. 46

FIGURA 14- Expressão gênica de Beta-integrina (B1), Beta-catenina, CDH1 (E-caderina), Vimentina, MMP2, MMP9 e TIMP-2 em células de carcinoma urotelial canino – SH, tratadas com mitoxantrona ou cúrcuma, em comparação com células controle (só em meio de cultura) e com veículo de diluição de cada fármaco. 48

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Câncer.....	14
1.2. Câncer de Bexiga.....	14
1.3. Compostos Naturais.....	16
1.4. Curcuma.....	16
1.5. O cão como modelo experimental.....	18
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivos Gerais.....	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Linhagens celulares e cultura celular	20
3.2. Fármacos e reagentes	20
3.3. Tratamento e avaliação da atividade metabólica celular	21
3.4. Ensaio de Apoptose e Necrose (ANEXINA V-FITC e IODETO DE PROPÍDIO).....	22
3.5. Expressão gênica.....	23
3.5.1. Extração de RNA total e qPCR	23
3.6. Ensaio de migração celular	28
3.7. Análise estatística	29
4. RESULTADOS	31
4.1. Ensaio de viabilidade celular através do MTT e cálculo do IC50	

4.2. Ensaio de apoptose e morte celular (Anexina V e Iodeto de Propídio)	35
4.3. Ensaio de migração celular no sistema <i>transwell</i>	41
4.4. Expressão gênica e avaliação de marcadores de invasão celular	42
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS	54
ANEXO	57

SILVA, T.O. Estudo comparado da resposta antitumoral *in vitro* da curcumina, curcuma homeopática e mitoxantrona em carcinoma urotelial de bexiga canino e humano. Botucatu, 2022. 56p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O carcinoma urotelial corresponde a 2% das neoplasias malignas do trato urinário, sendo a de maior ocorrência em bexiga. Seu tratamento inclui excisão cirúrgica, quimioterapia, inibidores de cicloxigenase (COX), radioterapia, ou a combinação desses. Entretanto, a intervenção cirúrgica muitas vezes é inviabilizada pela localização da lesão. Compostos obtidos de plantas vem ganhando destaque e gerando novas pesquisas na medicina. A curcumina é o principal composto ativo da cúrcuma e possui efeito antiproliferativo e próapoptótico satisfatório, já descrito em diferentes linhagens neoplásicas. Sua eficácia quando associados a diversos quimioterápicos tem sido avaliada na busca de aumentar seus efeitos e biodisponibilidade. Nosso estudo baseou-se na utilização de 3 linhagens tumorais caninas e 1 humana (AXA, AXC, SH e T24) para avaliar os efeitos da curcumina, *Curcuma longa* D6 e mitoxantrona. Analisamos a viabilidade celular, apoptose, necrose, migração celular e expressão de genes de invasão. A *Curcuma longa* D6, curcumina e mitoxantrona se mostraram eficazes na redução da viabilidade celular de cultura de carcinoma urotelial canino e humano, sendo a apoptose tardia o mecanismo de morte celular mais evidente. Ainda, observamos efeitos na redução na migração celular com o uso de *Curcuma longa* D6 nas linhagens SH e T24. A expressão de genes relacionados a invasão celular foi distinta entre os grupos e sugerem diferenças nas assinaturas gênicas das linhagem. Desta forma, deve-se incentivar e buscar maiores elucidações a cerca do uso da curcuma e seus derivados, associados ou não a quimioterápicos em células de carcinoma urotelial de bexiga canino.

Palavras-chave: Bexiga, urotelial, cão, curcumina, quimioterapia.

SILVA, T.O. Comparative study of the *in vitro* antitumor response of curcumin, homeopathic turmeric, and mitoxantrone in canine and human bladder urothelial carcinoma. Botucatu, 2022. 56p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Urothelial carcinoma corresponds to 2% of malignant neoplasms of the urinary tract, with the highest occurrence in the bladder. The treatment includes surgical excision, chemotherapy, cyclooxygenase inhibitors (COX), radiation therapy, or a combination of these. However, surgical intervention is often unfeasible due to the location of the lesion. Compounds obtained from plants have been gaining prominence and generating new research in medicine. Curcumin is the main active compound of turmeric and has a satisfactory antiproliferative and proapoptotic effect already described in different neoplastic lineages. Its effectiveness, when associated with several chemotherapeutic agents, has been evaluated in the search to increase its effects and bioavailability. Our study was based on the use of 3 canines and 1 human tumor cell line (AXA, AXC, SH, and T24) to evaluate the effects of curcumin, *Curcuma longa* D6, and mitoxantrone. We analyzed cell viability, apoptosis, necrosis, cell migration, and expression of cell invasion genes. *Curcuma longa* D6, curcumin, and mitoxantrone were shown to be effective in reducing the cell viability of canine and human urothelial carcinoma cultures, with late apoptosis being the most evident mechanism of cell death. Furthermore, we observed effects in the reduction of cell migration with the use of *Curcuma longa* D6 in the SH and T24 strains. The expression of genes related to cell invasion was different between the groups and suggests differences in the gene signatures of the lineages. In this way, we should encourage and seek further elucidations about the use of turmeric and its derivatives, associated or not with chemotherapeutics in canine bladder urothelial carcinoma cells.

Key words: Bladder, urothelial, dog, curcumin, chemotherapy.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O termo câncer segundo o Instituto Nacional de Câncer - INCA (2022), abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas, caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que sofreram mutação genética e adquirem capacidade invasiva e metastática. Os diferentes tipos de células no corpo determinam o tipo de câncer e suas características. Quando oriundos de tecidos epiteliais (pele e mucosas), são denominados carcinomas. Se a origem for de tecidos conjuntivos (osso, músculo ou cartilagem), são chamados sarcomas.

1.2. Câncer de Bexiga

A bexiga é um órgão reservatório responsável pelo armazenamento temporário da urina proveniente dos rins e ureteres que, posteriormente, será eliminada pela uretra no ato da micção. Ela é revestida por um epitélio de transição, uma camada muscular, adventícia e em algumas regiões uma serosa. Seu epitélio é composto por três camadas: superficial, intermediária e basal (ROSS, 2017).

O INCA (2022) estima, no Brasil, 10.640 novos casos de câncer de bexiga diagnosticados (7.590 em homens e 3.050 em mulheres) para cada ano do triênio 2020/2022. Ocupando a 7ª posição dos tumores mais incidentes em pacientes do sexo masculino.

Nos cães, a neoplasia de maior ocorrência natural em bexiga é o carcinoma urotelial (CUB), correspondendo a cerca de 2% de todos os tumores malignos do trato urinário, além de representar >90% das neoplasias malignas da bexiga. Todos os anos são registrados 10 mil novos casos desta neoplasia no mundo (FULKERSON & KNAPP., 2015; KNAPP & MCMILLAN., 2013; SAKAI *et al.*, 2018). Essa neoplasia é mais comumente vista em cães na faixa etária de 9 a 10 anos e em fêmeas (CARVALHO *et al.*, 2016).

Os CUBs caninos, em sua maioria, são neoplasias invasivas de alto grau e comumente localizados na região do trígono, podendo ou não acometer a uretra e a próstata em machos (KNAPP & MCMILLAN, 2013). Segundo Carvalho *et al.* (2016), esta neoplasia pode se apresentar de maneira nodular ou difusa, como um espessamento difuso da parede da bexiga e geralmente tem início no trígono e extensão para o corpo vesical.

Os sinais clínicos são locais e comuns a outras afecções do trato urinário inferior, como hematúria, disúria, polaquiúria, obstruções e complicações relacionadas à doença metastática nodais e distantes, presente em 16% a 14% dos cães (KNAPP *et al.*, 2000).

Sua etiologia ainda é desconhecida e alguns autores sugerem fatores como variantes genéticas hereditárias e exposições ambientais a herbicidas e inseticidas (KNAPP *et al.*, 2014).

Exames por imagem como a cistografia de contraste e a ultrassonografia são indispensáveis para o diagnóstico, além de que técnicas especiais de lavagem vesical e citocentrifugação podem ser úteis na distinção dos diagnósticos diferenciais. Já a urinálise é voltada à detecção de hematúria, leucocitúria e presença de bactérias associadas ao quadro, visto que a visualização de células neoplásicas nesta técnica é pouco frequente. A confirmação diagnóstica é realizada pelo exame histopatológico através de biópsias obtidas por cistoscopia ou laparotomia exploratória (HENRY, 2007).

O tratamento para o CUB inclui a cirurgia, quimioterapia, inibidores da ciclooxigenase (COX), radioterapia, ou a combinação destes, visando aumentar os efeitos anti tumorais (SOMMER *et al.*, 2018). Além disso, em muitos casos a intervenção cirúrgica é inviabilizada devido à apresentação comum em trígono e aos riscos de se desenvolver incontinência urinária, podendo resultar em morbidade e diminuição da qualidade de vida destes animais (D'AVILA *et al.*, 2016).

Dentre os quimioterápicos, a cisplatina, carboplatina, mitoxantrona, actinomicina D ou doxorubicina podem ser empregadas (TELLES *et al.*, 2017). O tratamento quimioterápico, isolado ou em associação, embora não curativo, é muito utilizado, pois pode promover o controle ou remissão desta doença (KNAPP, MCMILLAN, 2013). Estudos comparativos já demonstraram um tempo de sobrevida média de 181 dias para quimioterapias sistêmicas associado ao uso de piroxicam e 291 dias para a combinação de mitoxantrona e piroxicam (HENRY *et al.*, 2003).

Além disso, em muitos casos a intervenção cirúrgica é inviabilizada devido à apresentação comum em trígono e aos riscos de se desenvolver incontinência urinária, podendo resultar em morbidade e diminuição da qualidade de vida destes animais (D'AVILA *et al.*, 2016). Sendo assim, sua utilização tem como

objetivo o diagnóstico, ressecção de massas tumorais afastadas do trígono e restauração do fluxo urinário. (KNAPP & MCMILLAN, 2013).

Além disso, um estudo realizado por Knapp *et al.* (2014) demonstrou que a grande maioria das neoplasias da bexiga estão associadas a ocorrência de metástases, estando ou não correlacionadas a morte desses pacientes, uma vez que de 137 cães com diagnóstico de CUB, 58% apresentaram metástases à distância no exame de necropsia. Frequentemente encontradas nos linfonodos regionais, inguinais, ilíacos, pulmão, rins, e mais tardiamente em outros órgãos parenquimatosos (ZACHARY *et al.*, 2012).

Na medicina veterinária o tratamento dos CUBs ainda é desafiador, tendo em vista fatores como localização anatômica, grau de evolução da doença, diagnóstico frequentemente tardio, além de diagnósticos e planos terapêuticos equivocados (CARVALHO *et al.*, 2016).

1.3. Compostos Naturais

Atualmente os compostos obtidos de plantas vem ganhando destaque na medicina natural e existem diversos estudos que demonstram os benefícios gerados ao organismo. É uma prática milenar empregada na profilaxia e tratamento de doenças pela medicina tradicional desde a antiguidade. Os conhecimentos acerca dessas plantas têm sido disseminados de maneira crescente desde a década de 90, através de testes caseiros passados de geração a geração e posteriormente pesquisas farmacológicas aplicadas (ANTÔNIO *et al.*, 2014).

1.4. Curcuma

A *Curcuma longa* L. (Figura 1) pertencente à família das *Zingiberaceae*, originária da Índia e de ocorrência em regiões tropicais e subtropicais (NAIR, 2013). É conhecida popularmente por açafrão, açafoa, açafrão-da-terra, açafrão-da-índia, falso-açafrão, gengibre-dourado, gengibre-amarelo, batatinha-amarela, cúrcuma, mangarataia, turmérico ou turmerique (MARCHI *et al.*, 2016). A parte mais comumente utilizada da cúrcuma é a rizoma (raiz). Seus produtos são amplamente empregados como corante, tempero ou condimento alimentar, na forma de pó seco (BANIK *et al.*, 2017).



FIGURA 1. *Curcuma longa* L.
(Fonte: <https://ciplamasces.wordpress.com/2017/07/11/a-curcuma-ajuda-a-prevenir-o-cancer-de-prostata/>).

Os curcuminóides encontrados na cúrcuma são: a curcumina (77%), a desmetoxicurcumina (17%) e a bisdesmetoxicurcumina (3%). A curcumina (C₂₁H₂₀O₆) é o pigmento mais abundante e ativo da composição, exibe coloração amarelo-alaranjado que caracteriza o popular açafrão (BORGES, *et al.*, 2019).

A curcumina possui efeito terapêutico antioxidante, antifúngico, anti-inflamatório, antibacteriano, antitumoral, antiviral, cicatrizante, hipoglicemiante, neuroprotetor, antiparasitário e imunomodulador (MARCHI *et al.*, 2016; BORGES, *et al.*, 2019).

Estudos demonstraram como fator limitante a baixa biodisponibilidade da curcumina no organismo. Essa questão pode estar relacionada à característica lipofílica desse composto, gerando baixa absorção, rápido metabolismo e eliminação do organismo. Seu metabolismo ocorre por via hepática antes de alcançar a circulação sistêmica, além de metabolismo intestinal, o que reduz drasticamente sua fração utilizável nos órgãos-alvo (OZAWA, *et al.*, 2017; PRASAD *et al.*, 2014).

Com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade da curcumina, pesquisadores buscam algumas estratégias para aumentar a resistência deste composto. Dentre elas, associação à piperina, fracionamento a nanopartículas, lipossomas, micelas ou complexos fosfolipídicos e curcumina-β-D-glucuronida (curcumina monoglucuronida) (OZAWA, *et al.*, 2017).

O seu potencial antitumoral é frequentemente satisfatório e tem sido descrito em diferentes linhagens neoplásicas humanas, incluindo neoplasias pulmonares, mamárias e de bexiga. Nestas e outras, seus efeitos

antiproliferativos e pró-apoptóticos foram relatados. Bem como, estudos que apontam sua eficácia quando associados a diversos quimioterápicos e novas formulações da curcumina tem sido realizado com o intuito de aumentar sua biodisponibilidade e suas ações (COSTA, 2014).

Na medicina veterinária estudos com curcuminóides em neoplasias da bexiga urinária de cães ainda não foram realizados. Bem como sua aplicação em demais linhagens tumorais caninas ainda são escassas na literatura e, conseqüentemente, pouco exploradas.

1.5. O cão como modelo experimental

Estudos recentes demonstraram que o CUB canino possui semelhança ao CUB humano em diferentes aspectos (DE BROT *et al.*, 2018). O que o torna um modelo natural proveitoso no desenvolvimento de novos fármacos, bem como a análise comparativa de seus efeitos e na busca de estratégias diagnósticas para essa neoplasia (SOMMER *et al.*, 2018; SCHAEFER *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Frente ao potencial do uso de bio compostos no tratamento do câncer, seja pelos seus efeitos anti-neoplásicos isolados ou como adjuvantes à quimioterapia convencional, o presente estudo tem como objetivo avaliar a resposta anti-tumoral da curcumina, *Curcuma longa* D6 e cloridrato de mitoxantrona, em linhagens tumorais de CUB canino e humano.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito na viabilidade celular de cultura de carcinoma urotelial canino e humano *in vitro* após tratamento com curcumina, curcuma *Curcuma longa* D6 e cloridrato de mitoxantrona.
- Avaliar as taxas de apoptose e de necrose por citometria de fluxo com marcação de Anexina V e Iodeto de Propídio após tratamento com curcumina e cloridrato de mitoxantrona na linhagens de carcinoma urotelial de bexiga canino e humano.
- Avaliar a taxa de migração celular por ensaios de migração em placas de *transwell* de cultura de carcinoma urotelial canino e humano *in vitro* após tratamento com curcumina e cloridrato de mitoxantrona.
- Avaliar a expressão de genes de invasão celular e relacionados a transição epitelial mesenquimal por PCR em cultura de carcinoma urotelial canino *in vitro* após tratamento com curcumina, *Curcuma longa* D6 e cloridrato de mitoxantrona.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FMVZ/UNESP, número 0181/2020).

3.1. Linhagens celulares e cultura celular

Para a realização deste estudo foram utilizadas três linhagens tumorais caninas, K9TCC-PU-AXA, K9TCC-PU-AXC e K9TCC-PU-SH, abreviados para AXA, AXC e SH respectivamente. Estas, foram cordialmente fornecidas pela Dra Deborah Knapp da Universidade de Purdue, West Lafayette, EUA, estabelecidos a partir de neoplasias de bexiga de fêmeas caninas com diagnóstico de carcinoma de células de transição invasivo Grau I/II. As linhagens AXC e AXA são oriundas do mesmo animal, contudo separadas *in vitro* pelo processo de tripsinização diferencial (DHAWAN *et al.*, 2009).

A linhagem tumoral humana T24 (Clone HTB-4) pertencente a ATCC (American Type Culture Collection - Manassas, VA, USA) foi concedida pelo Laboratório de farmacologia aplicada da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil), pela Professora Fernanda Bueno Morrone. A linhagem foi obtida a partir de um carcinoma urotelial de bexiga humano grau III, proveniente de uma paciente de 81 anos do sexo feminino (BUBENIK, *et al.* 1973). As linhagens foram testadas através de PCR para averiguar se havia contaminação por *Mycoplasma* sp e testaram negativo.

As células foram mantidas em cultura bidimensional (2D), inseridas em frascos de cultivo de 25 e 75 cm², nutridas regularmente com meio DMEM-Ham's F-12 (LGC Biotechnology, Cotia, SP, Brasil) contendo de 10% a 20% de Soro Fetal Bovino (SFB, LGC Biotechnology, Cotia, SP, Brasil), 1% de gentamicina e 0,5% de antibiótico-antimicótico (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Mantidas em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ a 37°C e submetidas a manutenções de cultivo, passagens e congelação de acordo com a taxa de proliferação e comportamento de crescimento individual.

3.2. Fármacos e reagentes

A curcumina foi obtida da Sigma-Aldrich© (Referência C1386). A concentração da solução estoque foi de 25mg de curcumina em DMSO como excipiente. As concentrações finais nos ensaios foram de 12.000, 14.000, 16.000 e 18.000ng/ml.

A *Curcuma longa* D6 (homeopática) foi utilizada na dinamização D6 (InjectCenter®), tendo como diluente solução fisiológica. As concentrações utilizadas nos ensaios de viabilidade foram de 5, 10, 15 e 20 μ M.

O cloridrato de mitoxantrona utilizado trata-se da formulação comercial Evomixan® (Farmarin Indústria e Comércio LTDA, Guarulhos, BR), que consiste em uma solução injetável de coloração azulada apresentado na concentração de 20mg (10ml). As concentrações utilizadas nos ensaios de viabilidade foram de 5, 10, 20 e 40 μ M.

A solução estoque de MTT foi preparada utilizando-se 0,013 g de MTT (Invitrogen™, M6494) dissolvida em PBS (2,5ml). 1ml da solução estoque de MTT foi diluída em 10ml de meio sem SFB para atingir a concentração final de 0,5 mg/ml.

3.3. Tratamento e avaliação da atividade metabólica celular

Com a intenção de avaliar os efeitos dos tratamentos antitumorais das linhagens tumorais de carcinoma urotelial caninos e humano foi realizado o ensaio colorimétrico de viabilidade celular, MTT.

O ensaio de viabilidade celular MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) fornece uma estimativa do número de células metabolicamente ativas. Isto é baseado na redução do composto amarelado MTT pela desidrogenase mitocondrial de células intactas para um sal formazan roxo. Este efeito colorimétrico é captado por absorbância e os valores são convertidos em viabilidade e analisados (MOSMANN, 1983).

A fim de testar o efeito das 3 substâncias e obter o IC50, T24, AXA, AXC e SH foram expandidas em cultivo até a confluência de 80%, desagregadas enzimaticamente, centrifugadas e contadas utilizando a solução de azul de tripan 0,2% com o auxílio de um microscópio óptico e câmara de Neubauer. Em sequência as células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^4 células/100 μ L de meio de cultura completo e incubadas por 24h em estufa com 5% de CO₂. Posteriormente, o meio foi substituído por meio de cultura sem SFB contendo as diluições finais da curcumina (12.000, 14.000, 16.000 e 18.000 ng/ml); *Curcuma longa* D6 (5, 10, 15 e 20 μ L/ml), mitoxantrona (5, 10, 20 e 40 μ M) e dois grupos controles - células e meio e DMEM puro + DMSO (veículo da curcumina), solução fisiológica (veículo da *Curcuma longa*

D6) e água de injeção (veículo da mitoxantrona); a fim de determinar se existe influência na viabilidade das células. As placas foram incubadas por 72h com a curcumina ou *Curcuma longa* D6 ou 24h com a mitoxantrona.

Na sequência, as diluições foram removidas e as placas retornaram à incubação com 0,1 ml de solução de MTT/ poço por 4 horas até a formação completa dos cristais de formazan roxo.

O momento da leitura consistiu na remoção da solução de MTT e dissolução dos cristais roxos em 200µL de *dimethyl sulfoxide* (DMSO)/poço. Os valores de absorbância foram obtidos na faixa de 570nm em leitor de microplaca (Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader, Biochrom Ltd., Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4. Ensaio de Apoptose e Necrose (ANEXINA V-FITC e IODETO DE PROPÍDIO)

O ensaio de anexina V e Iodeto de propídio foi escolhido para determinar a porcentagem de apoptose e morte celular por necrose induzida pelos tratamentos apresentados. O procedimento consiste na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina, na membrana das células que estão iniciando o processo apoptótico, e na ligação do iodeto de propídeo ao DNA das células no processo final da apoptose.

Desta forma, células em apoptose inicial demonstram marcação somente para Anexina-V (AN+) / (PI-), células em apoptose tardia aquelas com dupla marcação de Anexina V e PI (An+) / (PI+), células mortas com marcação de Iodeto de propídio somente (An-)/(Pi+) e células viáveis as que não apresentam nenhuma marcação.

Para este feito, as células foram semeadas (1×10^5) em garrafas de 25 cm² e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Em seguida, foram tratadas com curcumina, *Curcuma longa* D6, mitoxantrona e suas respectivas soluções de controle nas concentrações determinadas como IC₅₀. Para este experimento utilizou-se uma garrafa de 25 cm² para cada tratamento e seu respectivo veículo.

Foi utilizado o Kit de detecção de apoptose Anexina V/Iodeto de Propídio (PI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) de acordo com as instruções do próprio fabricante. Deste modo, após o período de incubação com os compostos, as

células foram tripsinizadas, centrifugadas e posteriormente lavadas com solução tampão. O *pellet* celular foi ressuspenso em 300µL de tampão de ligação e em seguida acrescentados 5µL de Anexina V-FITC, 10µL de iodeto de propídio e 5µL de hoechst. As células foram então incubadas na ausência de luz e em temperatura ambiente por 10min.

Os dados foram obtidos em citômetro de fluxo (LSR Fortessa, BD Biosciences) utilizando o *software* FACSDiva Version 6.2.

3.5. Expressão gênica

3.5.1. Extração de RNA total e qPCR

O RNA total foi extraído com o uso do reagente TRIZOL®, conforme o protocolo do fabricante (Invitrogen). Para tal, utilizou-se 1 poço (500.000 céls) para cada tratamento e seus respectivos controles (DMEM e veículo) em placa de 6 poços, que foram ressuspensas cada em 1 mL do reagente TRIZOL. As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente com posterior adição de 200 µL de clorofórmio aos tubos. Após homogeneização por 3 minutos e incubação a temperatura ambiente pelo mesmo tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo tubo com auxílio de micropipeta, sendo então adicionados 500 µL de álcool isopropílico a 100%. As amostras foram incubadas por 10 minutos e a seguir centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, posteriormente, realizou-se duas lavagens com álcool etílico a 75% e centrifugação a 8.000 x g por 5 minutos segundos a 4°C. O RNA total foi eluído 20 µL em água livre de nuclease.

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies) usando absorbância a 260 nm.

Para eliminação de qualquer contaminação com DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com DNase. Para tal, ao RNA total (1µg) foram adicionados 2 µL de DNase (1u/ µL) (Invitrogen), 2 µL de tampão (10x com MgCl₂) e água livre de nuclease para completar o volume final de 10 µL. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos, sendo a enzima inativada pela adição de 2 µL de EDTA (25 mM) e incubando por 10 minutos a 65°C.

Para a realização da transcrição reversa, a cada amostra de RNA tratada com DNase adicionou-se 2 µL de *random primer* (10X), 0,8 µL de dNTP mix

(dGTP, dCTP, dATP, dTTP – 100 mM), 2 µL de tampão de reação (10x), 4,2 µL de água livre de nuclease juntamente com 1 µL *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50 unidades/ul) – High Capacity Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems). As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos e 120 minutos a 37°C, com posterior inativação da enzima a 70°C por 5 minutos. O cDNA assim obtido foi diluído na razão 1/10.

O *master mix* usado nas reações de PCR em Tempo Real foi o *PowerUp SYBR Green /Master Mix* (2X) (Applied Biosystems). O volume total da reação por amostra foi de 10µL, sendo esta realizada em duplicata empregando placas de 384 poços no equipamento QuantStudio 12K flex com a seguinte ciclagem: ativação UDG a 50°C por 2 minutos, ativação *Dual Lock* DNA polimerase a 94°C por 2 minutos, com 40 ciclos de denaturação a 94°C por 3 segundos e anelamento/extensão a 94°C por 30 segundos, após a reação, o produto de PCR foi submetido a curva de dissociação (95°C por 15 segundos, 60°C por 1minuto, aumento contínuo da temperatura, 0,5°C por segundo, até 95°C).

Para o cálculo da expressão gênica foi usado o $\Delta\Delta Ct$ (Livak e Schmittgen, 2001), o qual se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal foi usada a fórmula de Quantificação Relativa - $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde QR representa o nível de expressão gênica; Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial; ΔCt se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene endógenos, e $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse em determinado tempo e o ΔCt da amostra de referência.

A eficiência da reação foi determinada por meio de diluições seriadas (1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000) do cDNA com gradiente de concentração dos oligonucleotídeos entre 400 e 800nM. A partir do valor de Ct de cada alíquota, a curva padrão foi elaborada e o *slope* da reta foi determinado. Este valor foi então inserido na seguinte fórmula: $10^{-(1/slope)}$. Adotou-se valores de eficiência perto de 100%.

O desenho dos oligonucleotídeos para amplificação dos genes alvos e dos genes endógenos foi realizado usando o *software Primer Express 3.0* (Applied Biosystems), representados na tabela 2 e tabela 3

TABELA 1- Componentes da reação de qPCR para quantificação da expressão relativa.

Reagentes	Volume e concentração
<i>PowerUp SYBR Green Master Mix (2X)</i>	5,0 µL (1x)
<i>Oligos - Forward e Reverse (10 mM)</i>	0,4-0,8 µL (400-800 nM)
cDNA	1,5 µL
Água	Completar para volume final de 10 µL

TABELA 2- Oligonucleotídeos para amplificação de genes alvos e endógenos humanos.

Alvos
A3 Integrina F 5' GCCCACCTGGTGTGACTTCT 3' R 5' CGTGGTACTTGGGCATGATCT 3'
B1 Integrina F 5' AGCCATTTGCAAGGTTTTATCC 3' - R 5' GGATTCAGGGTTTCTCAGATGTAA3'
Beta Catenina F 5' GATACCCAGCGCCGTACGT3' - R 5' GACCCCTCCACAAATTGC 3'
E Caderina F 5' CAGGCCTCCGTTTCTGGAA - R 5' AGGAGAGGAGTTGGGAAATGTG 3'
MMP2 F 5' TGAGCTATGGACCTTGGGAGAA 3' - R 5' CCATCGGCGTTCCCATAC 3'
MMP9 F 5' GGACGATGCCTGCAACGT 3' - R 5' CAAATACAGCTGGTTCCCAATCT3'
TIMP2 F 5' GGGCCAAAGCGGTCAGT 3' - R 5' TAGGGTTGCCATAAATGTCGTTT 3'
TIMP2 F 5' GGGCCAAAGCGGTCAGT 3' - R 5' TAGGGTTGCCATAAATGTCGTTT 3'
Vimentina F 5' GGGCCAAAGCGGTCAGT 3' - R 5' TAGGGTTGCCATAAATGTCGTTT 3'
Endógenos
ACTINA B F 5' TTCCTGGGCATGGAGTC 3' - R 5' GAGGTCTTTGCGGATGTC 3'

GAPDH F 5' TGCACCACCTGCTTA 3' - R 5' GATGCAGGGATGATGTT 3'
HPRT F 5' TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG 3' - R 5' GGCCTCCCATCTCCTTCATC3'
RPS13 F 5' CCAGTCGGCTTTACCCTATCG 3' - R 5' TGTGCAACATGTGAATCTC 3'

TABELA 3- Oligonucleotídeos para amplificação de genes alvos e endógenos em cachorro.

Alvos
B1 Integrina F 5' GGGATGAAGTCTTGGAGCTGTT 3' - R 5' CCAGGAATGCCCCAAAATC3'
Beta Catenina F 5'GGTTCCTGCCCCATCAGGAT 3' - R 5'GCTGCTGTGTTCCACCCATA 3'
E Caderina F 5'CAGCATGGACTCAGAAGAAAG 3' - R 5'TTCCGGGCAGCTGATAGG 3'
MMP2 F 5' ACGCCATCCCGGATAACC 3' - R 5' AGCTATGACCACTGCCTTGCA 3'
MMP9 F 5' CCCTGAAACACGCATGACAT 3' - R 5' AAGCGGTCCTGGCAGAAGTA 3'
TIMP2 F 5' CCCTGGACATCGGAGGAAA 3' - R 5' CGTTCCCCTCGGCCTTT 3'
Vimentina F 5' GCTCGTCACCTTCGGGAGTA 3' - R 5' ATCTCAATGTCGAGAGCCATCTTA 3'
ENDÓGENOS
GAPDH F 5' CATCAACGGGAAGTCCATCT3' - R 5' TACTCACCACCAGCATCACC 3'
HPRT F 5' AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC 3' - R 5' TTATAGTCAAGGGCATATCC3'
RPS5 F 5' TCACTGGTGAGAACCCCT 3' - R 5' CCTGATTCACACGGCGTAG 3'

3.6. Ensaio de migração celular

Para esse experimento foram utilizadas placas para *transwell* de 24 poços de 6,5 mm de diâmetro com poros de 8 µm e membrana de polycarbonato (Costar – Corning, MA - USA). Na placa, considerou-se as seguintes subdivisões: grupo do controle DMEM e controle solução fisiológica e tratamento com os três compostos na concentração do IC previamente estabelecido pelo ensaio de MTT.

Na parte inferior dos poços foram adicionados 800 µl de DMEM F12 com 10% de SFB, atuando como quimioatrativo. Nos insertos, as células tumorais na concentração de 5×10^4 cél/poço foram suspendidas em 200 µl de meio livre de soro, contendo as diluições respectivas aos grupos tratados e não tratados. As placas foram incubadas por 24h a 37°C, 5% CO₂.

As células que migraram foram fixadas em álcool metílico 100% por 8 minutos. Na sequência, um *swab* foi utilizado para remover as células depositadas na parte superior dos insertos, facilitando assim a visualização das células que atravessaram os poros.

Para a visualização, 800µl de solução de corante Giemsa (Sigma Aldrich, Merck™, GER) foram adicionados aos poços por 15 minutos, seguido pela remoção do mesmo e lavagem dos insertos em água. Após a secagem, realizou-se as leituras em microscópio óptico invertido utilizando uma lâmina histológica

Considerou-se a captura de imagem (Aumento de 100x) e contagem de quatro campos de cada membrana, evitando-se os bordos da membrana. Para cada tratamento os experimentos foram realizados em quadruplicata (quatro poços por tratamento).

A figura 2 ilustra todas as etapas previamente descritas.

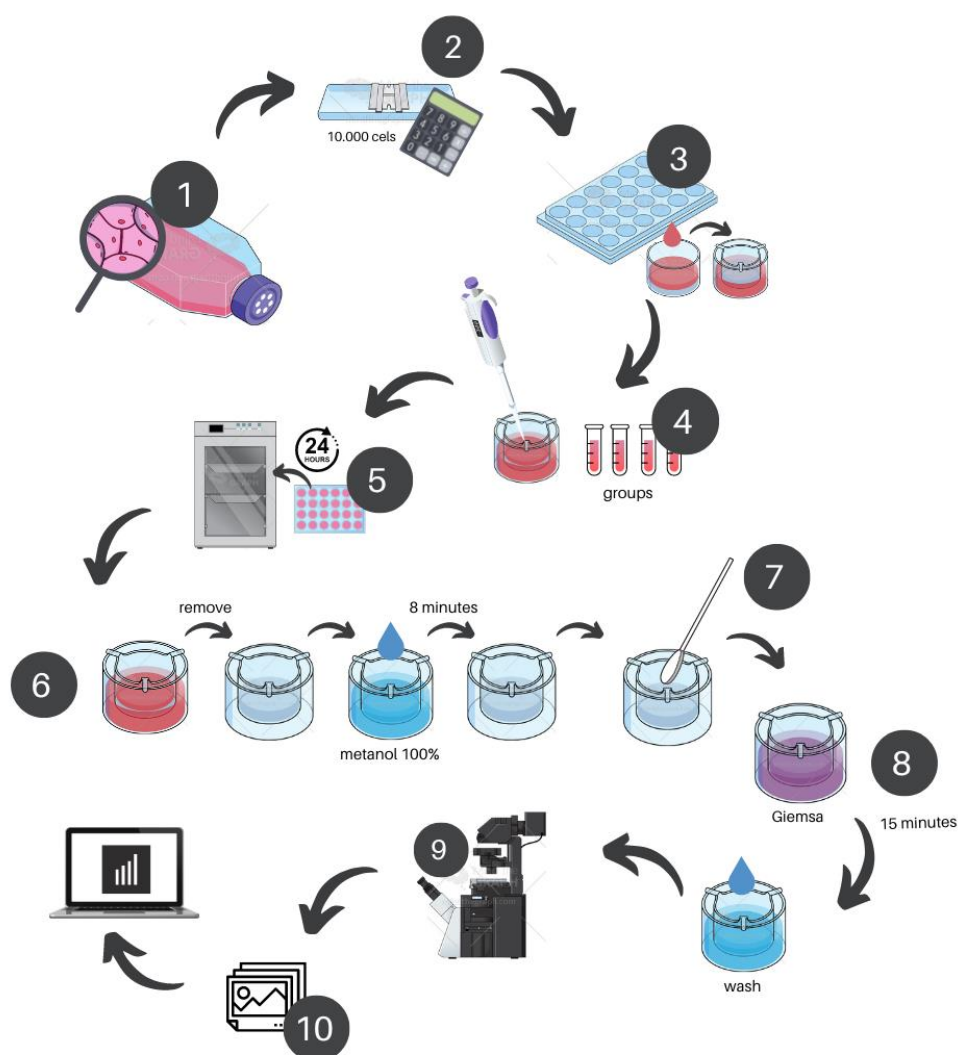


FIGURA 2- Esquemática das etapas do desenvolvimento do ensaio de migração celular pelo método *transwell*.

3.7. Análise estatística

As análises estatísticas das comparações entre as diferentes concentrações de tratamento foram feitas utilizando Teste T e significância estatísticas considerada se $p < 0.05$, deste modo.

A fórmula usada para determinar a viabilidade celular foi:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(A_{\text{tratamento}} - A_{\text{branco}})}{(A_{\text{diluyente}} - A_{\text{branco}})} \times 100\%$$

Considerando: A= absorbância, Diluyente= Diluyente do fármaco, Branco= sem células.

As análises de migração celular, expressão gênica em relação ao grupo

controle e veículo e gráficos foram gerados utilizando o programa *Graph Pad Prism* 8.0 (San Diego, CA, USA) e Microsoft R Excel, 2016.

A contagem das células pelas micrografias das membranas dos insertos de *transwell* foi realizada utilizando o software *Image J*.

Resultados estatisticamente significantes foram considerados quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio de viabilidade celular através do MTT e cálculo do IC50

A fim de identificar a melhor dosagem (IC50) de trabalho e alcançar os efeitos citotóxicos dos compostos curcumina, curcuma homeopática e mitoxantrona nas três linhagens de carcinoma urotelial canino, AXA, AXC e SH e humana T24, optou-se pelo ensaio de MTT. As quatro linhagens foram tratadas com 4 dosagens seriadas de curcumina e curcuma D6 durante 72 horas, e 24 horas para os tratamentos com o cloridrato de mitoxantrona (Evomixan®). Os experimentos foram realizados em duplicata e triplicata.

Quanto aos efeitos da curcumina, houve um efeito citotóxico e consequente diminuição da viabilidade celular nas quatro linhagens de maneira significativamente estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle. Analisamos o IC50 da curcuma nas linhagens, e o mesmo foi identificado nas 4 linhagens no período de 72 horas (Figura 3). Os valores de IC50 das 3 linhagens caninas (12.996, 14.027 e 13.779 ng/ml) foram bem próximos e evidenciaram uma maior resistência ao tratamento, onde o efeito revelou-se mais pronunciado nas maiores dosagens, indicando maior resistência das células. A linhagem tumoral AXC apresentou um valor de IC50 de 14027 ng/ml, 7,34% maior que a linhagem AXA com um IC50 de 12998 ng/ml, a qual possui a mesma origem. Enquanto que a linhagem tumoral humana mostrou maior sensibilidade, visto que o valor do IC50 (7.374 ng/ml) foi menor em comparação às demais células e o efeito foi bem pronunciado e não apresentado de maneira dose-dependente.

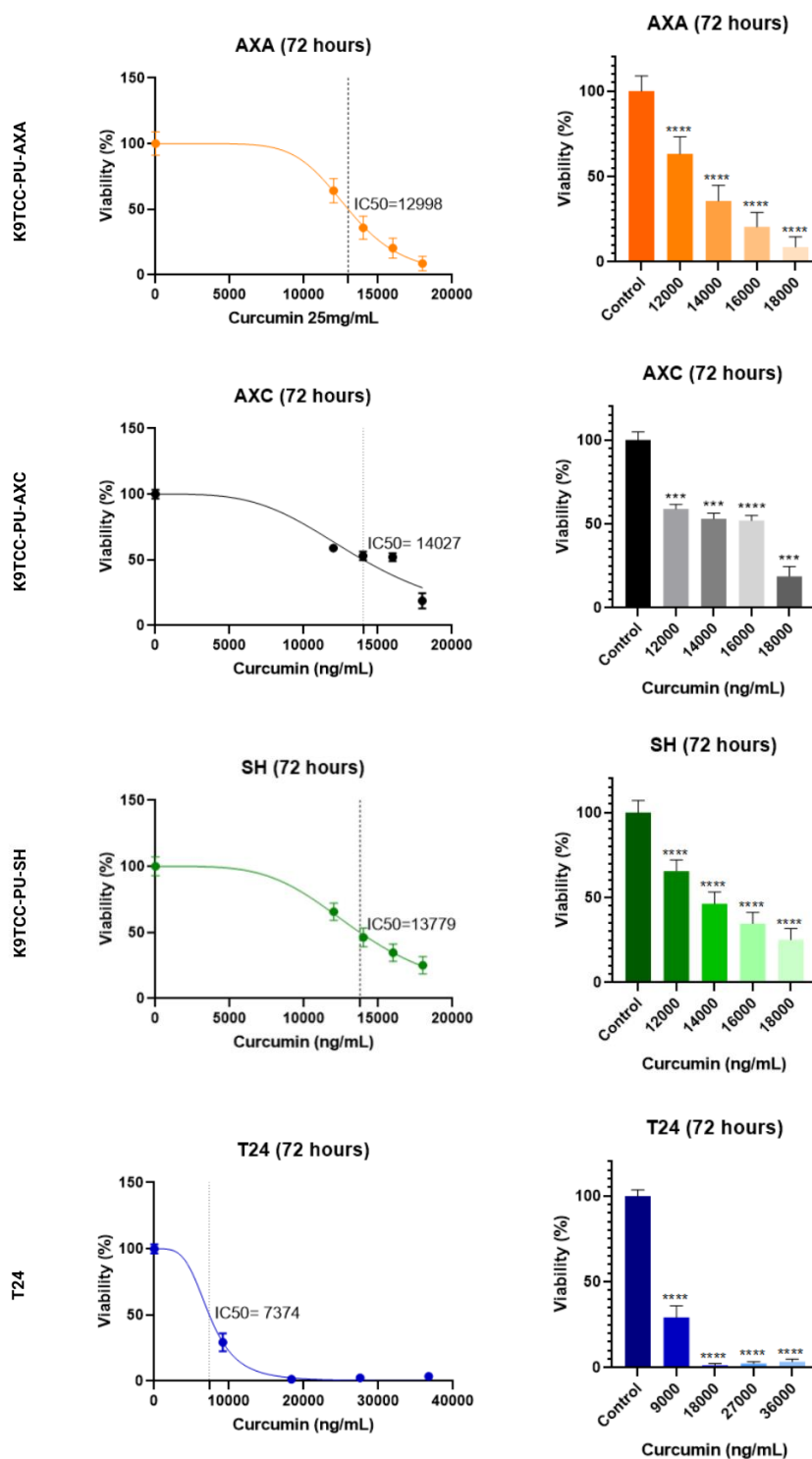


FIGURA 3- Efeito da curcumina na proliferação celular e valores de IC₅₀ das linhagens K9TCC-PU AXA, AXC e SH caninas e T24 humana, após 72 horas de incubação. Controle: veículo. **** = $p < 0,001$ e ***** = $p < 0,0001$.

Os ensaios de viabilidade com a utilização da *Curcuma longa* D6 (InjectCenter©) demonstrou efeitos semelhantes sobre as linhagens caninas, visto pelos decréscimos na curva de viabilidade de maneira dose-dependente e valores de IC₅₀ de 13,94, 10,40 e 14,72 $\mu\text{L/ml}$. A linhagem humana, contrário

aos efeitos do composto curcumina, demonstrou-se mais resistente aos efeitos da Curcuma D6, o valor de IC₅₀ foi de 19,96 μ L/ml e não houve resposta significativa nas concentrações mais baixas (5 e 10 μ L/ml) (Figura 4).

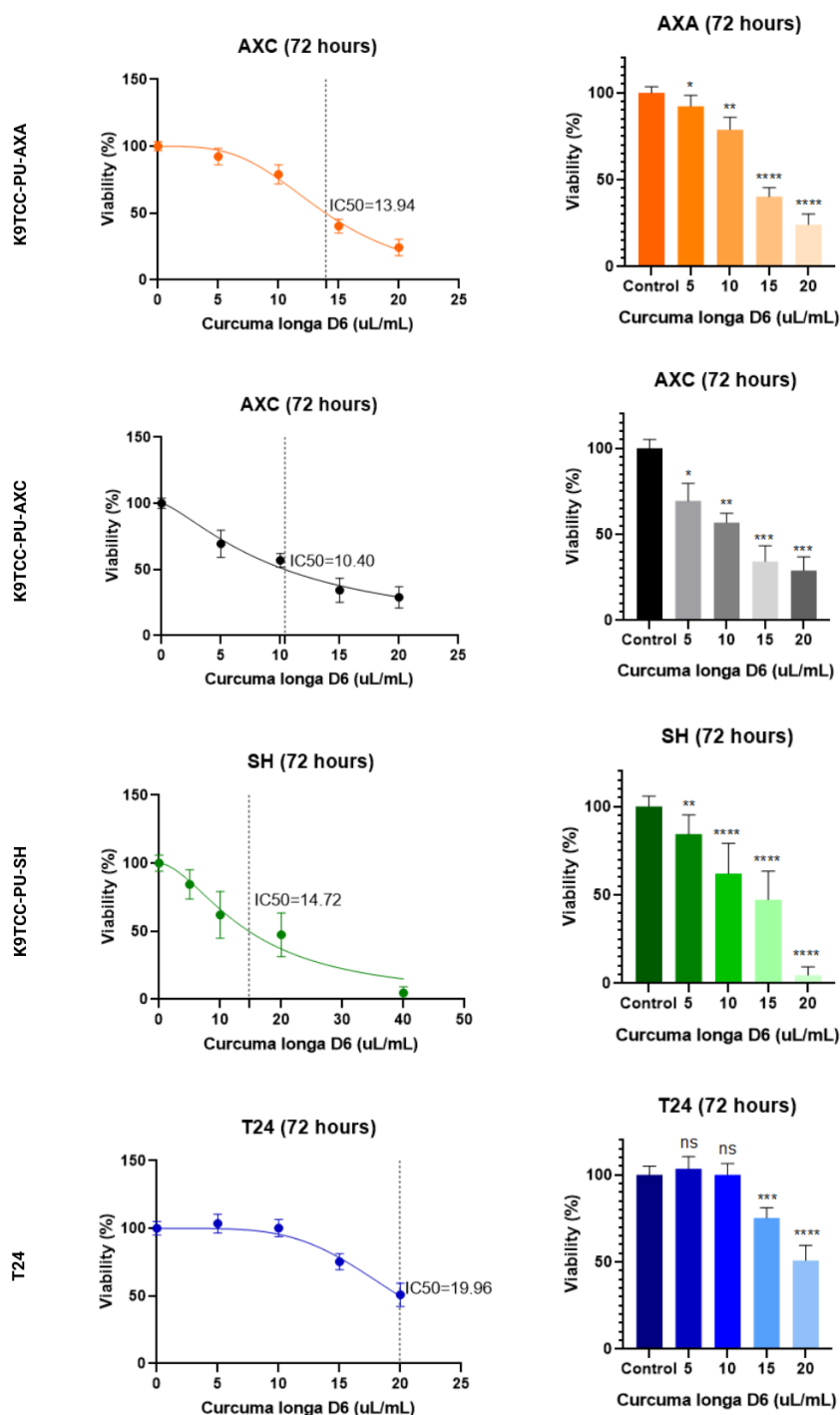
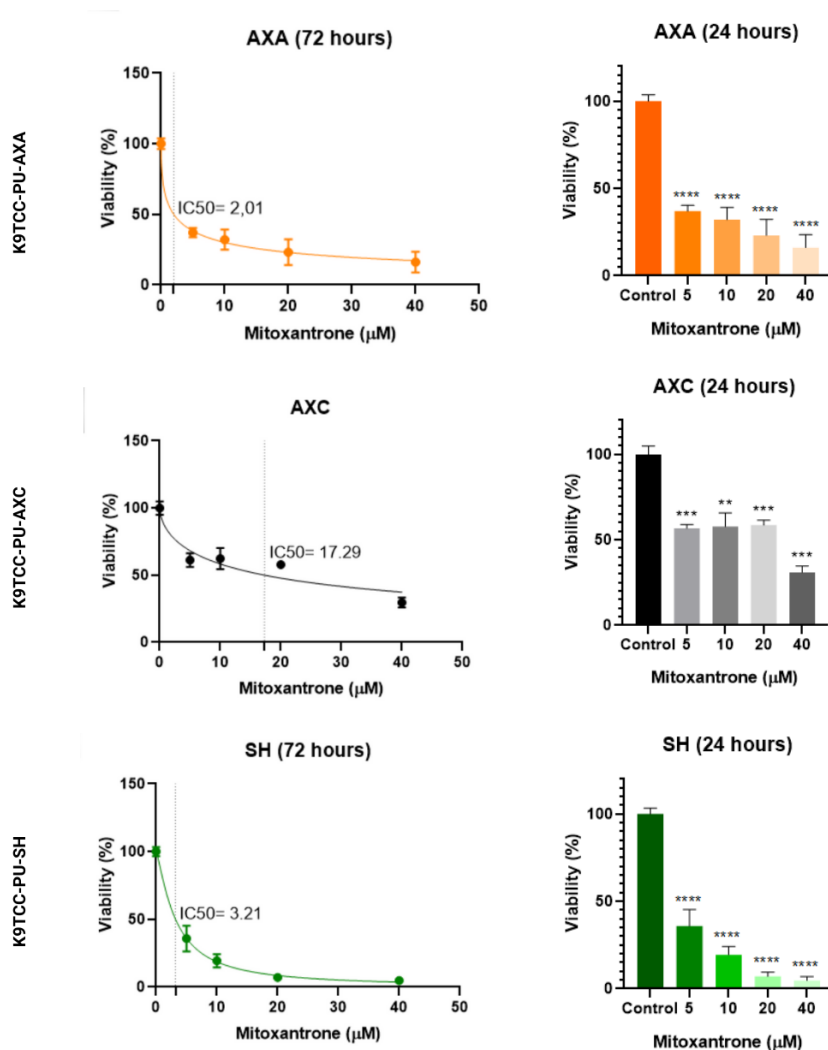


FIGURA 4- Efeito da *Curcuma longa* D6 na proliferação celular e valores de IC₅₀ das linhagens K9TCC-PU AXA, AXC e SH caninas e T24 humana, após 72 horas de incubação. Controle: veículo. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$ e n.s = sem significância.

Os ensaios com a utilização do quimioterápico cloridrato de mitoxantrona (Evomixan®), demonstraram uma maior sensibilidade nas linhagens AXA e SH, visto os valores de IC50 de 2,01 e 3,21 μ M respectivamente. Ambas tiveram uma queda abrupta na viabilidade celular logo nas concentrações iniciais (5 e 10 μ M), e efeitos de citotoxicidade dose-dependente. Quanto às linhagens AXC e T24 o IC50 foi de 17,29 e 21,82 μ M, demonstrando uma maior resistência às concentrações utilizadas. A linhagem AXC demonstrou uma constância na viabilidade com os tratamentos com as concentrações de 5, 10 e 20 μ M. Enquanto que a linhagem T24 mostrou seus efeitos de forma dose-dependente (Figura 5).



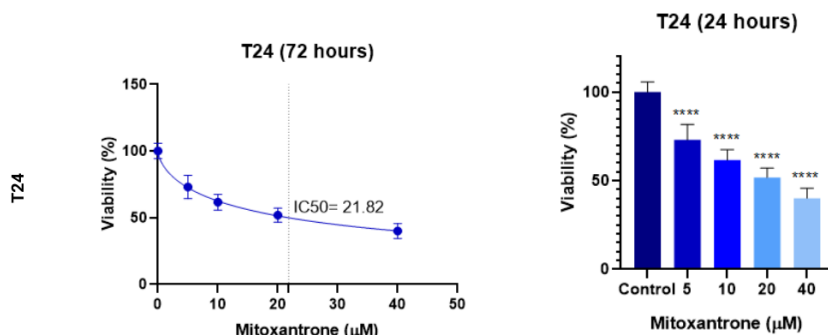
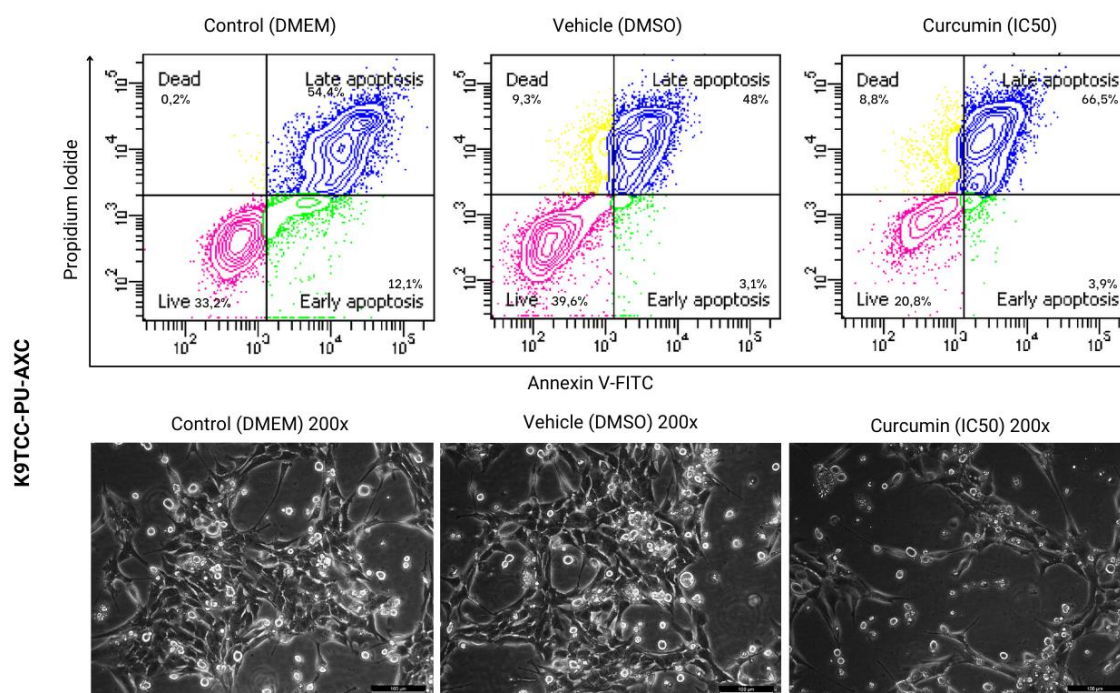
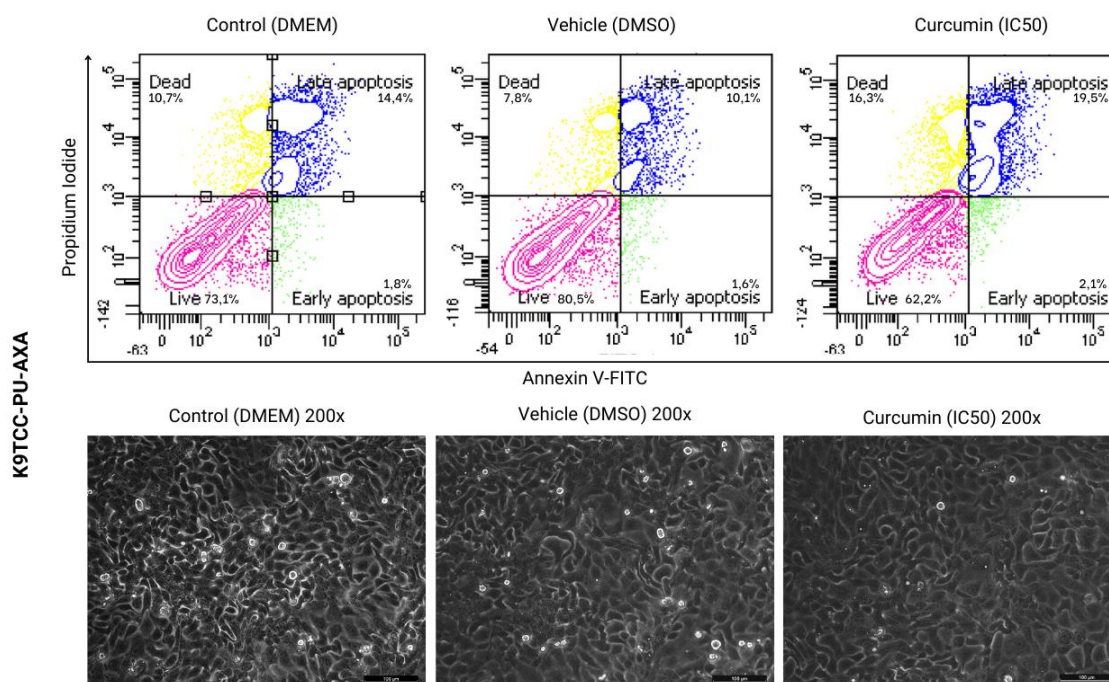


FIGURA 5- Efeito do cloridrato de mitoxantrona (Evomixan®) na proliferação celular e valores de IC50 das linhagens K9TCC-PU AXA, AXC e SH caninas e T24 humana, após 24 horas de incubação. Controle: veículo. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

4.2. Ensaio de apoptose e morte celular (Anexina V e Iodeto de Propídio)

As células das linhagens caninas AXA, AXC e SH foram submetidas ao ensaio de indução de apoptose na presença e na ausência da curcumina e cloridrato de mitoxantrona (Evomixan®) na concentração do IC50 e seus veículos, usando o ensaio de Anexina V/IP por citometria de fluxo. O quadrante superior esquerdo representa o grupo de células necróticas, o da direita o grupo de células em apoptose tardia. As células que estão no quadrante inferior direito representam o grupo de células em apoptose inicial e o quadrante inferior da esquerda, as células viáveis.

Os efeitos acerca da utilização da curcumina na linhagem tumoral AXA, demonstra alterações por indução da apoptose tardia e necrose após tratamento de 72 horas com a concentração do IC50 (13.000ng/ml). Enquanto que na linhagem AXC esse efeito se dá quase que exclusivamente por eventos de apoptose tardia (48 para 66,5%) frente a concentração de 14.000ng/ml. Na linhagem SH não se observou redução do número de células mortas e na T24 a resposta ao tratamento baseia-se em eventos de morte celular por necrose, apoptose tardia e recente (Figuras 6 e 7).



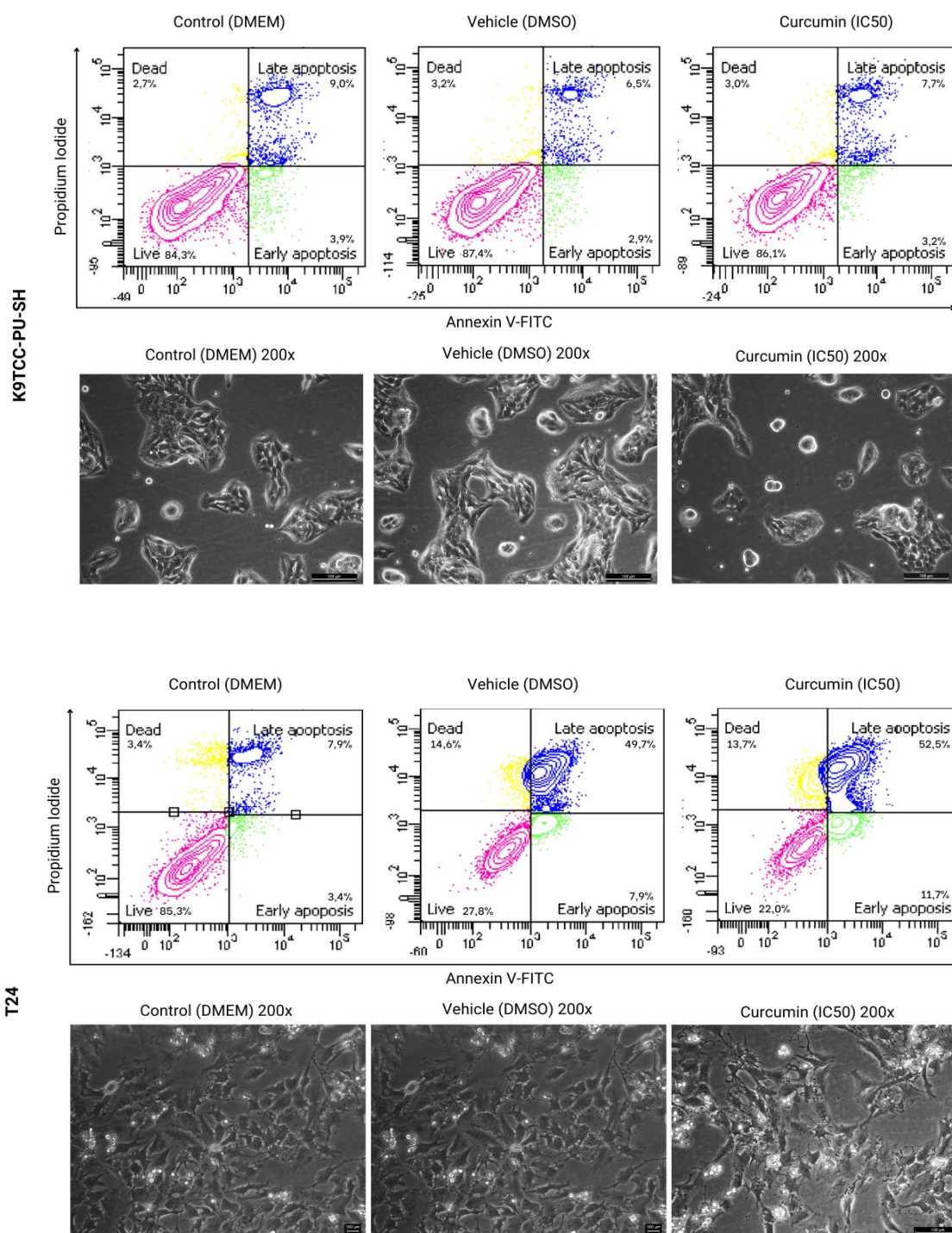


FIGURA 6- Citometria de fluxo usando anexina V-FITC/PI após 72h de incubação com curcumina em células tumorais caninas AXA, AXC E SH, e T24 humana. O controle negativo (Vehicle) trata-se da utilização do DMSO na mesma concentração do tratamento. A curcumina (IC5), foi utilizada como controle positivo.

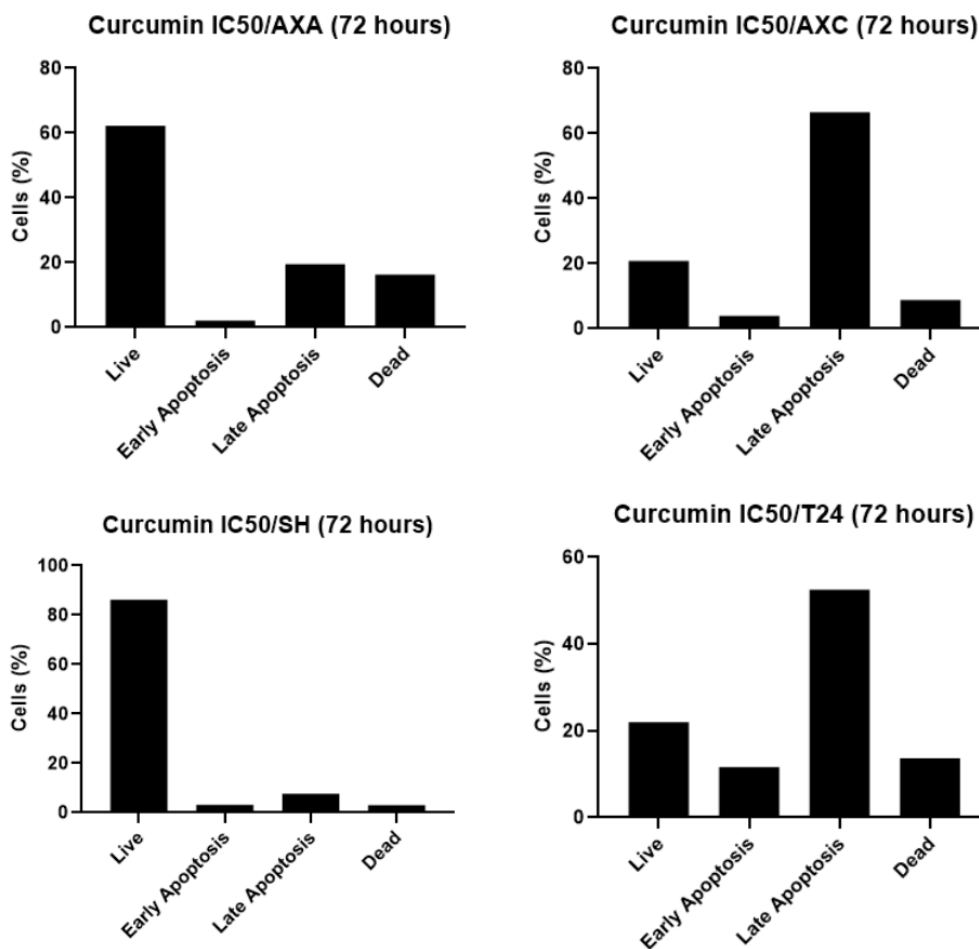
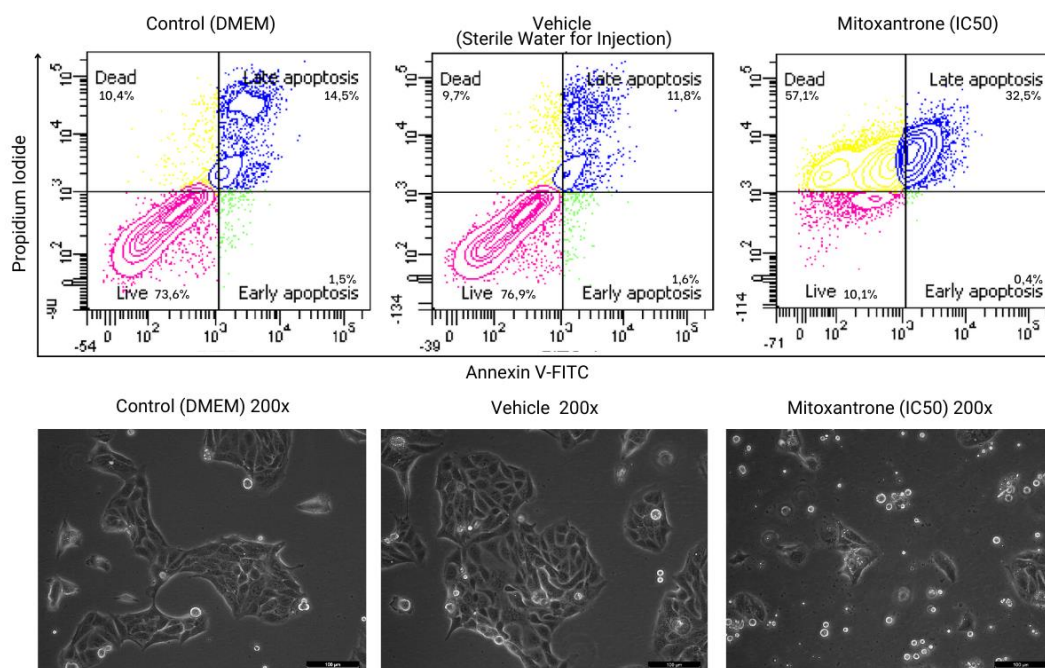


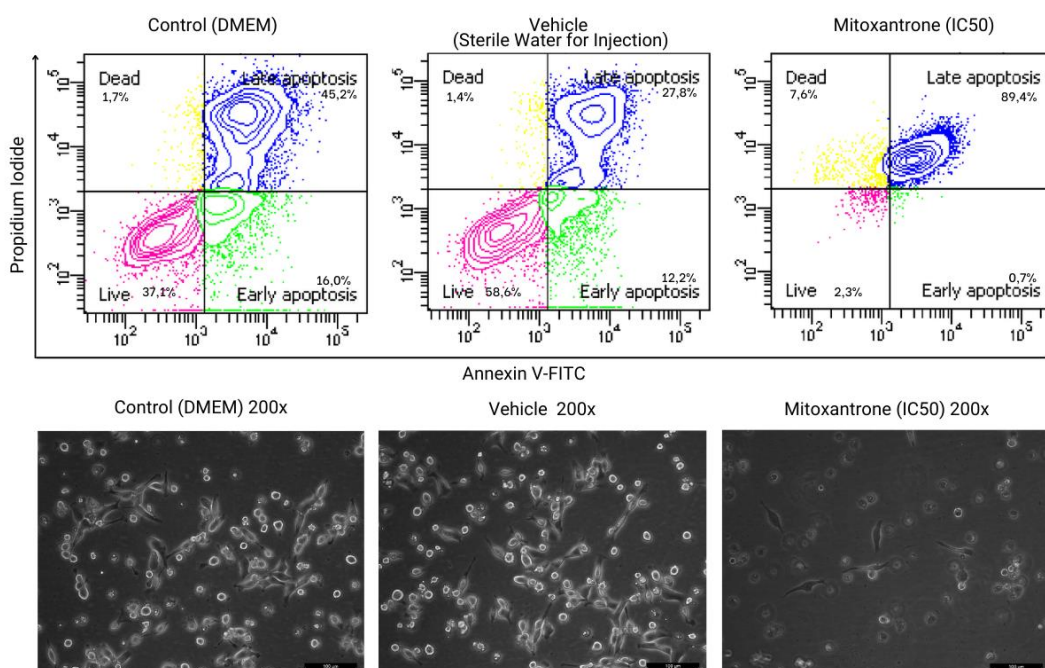
FIGURA 7- Efeito da curcumina na indução de apoptose em células tumorais caninas AXA, AXC E SH, e T24 humana frente a concentração do IC50, determinadas por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/PI após 72h de incubação.

Em relação aos ensaios com o cloridrato de mitoxantrona (Evomixan®) nas linhagens caninas, o efeito é similar, tendo seu efeito antitumoral instituído principalmente por eventos de apoptose tardia nas três linhagens e necrose pronunciada nas linhagens AXA e SH (Figuras 8 e 9). Não foi possível realizar o teste na linhagem T24 por falta de células, bem como da *Curcuma longa* D6 D6.

K9TCC-PU-AXA



K9TCC-PU-AXC



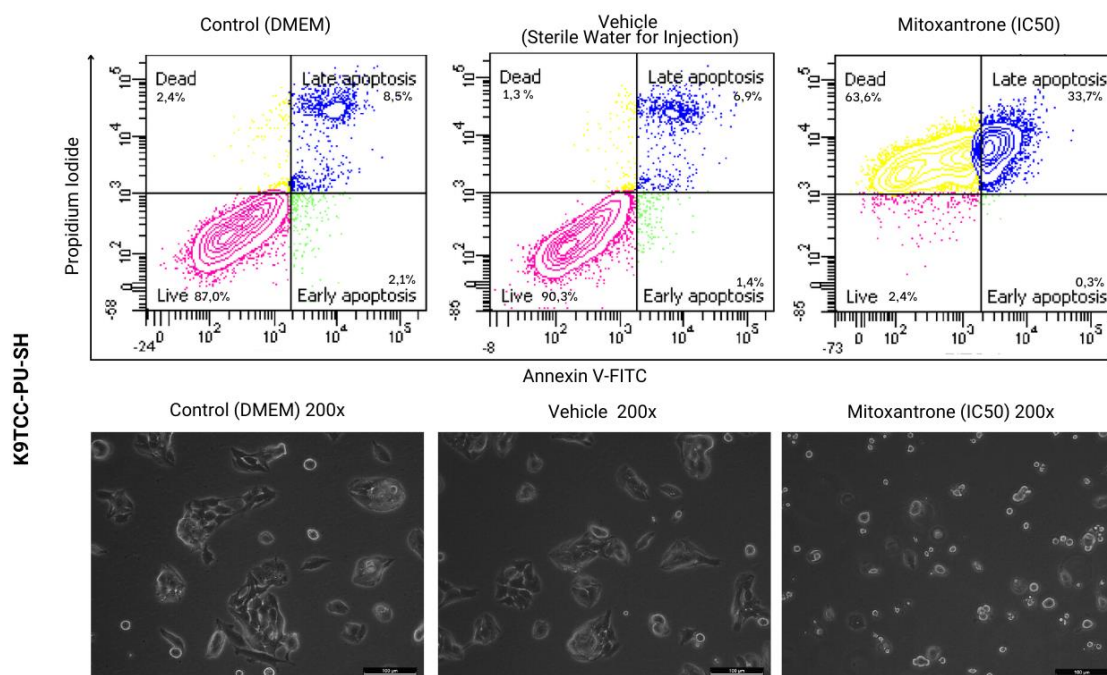


FIGURA 8- Citometria de fluxo usando anexina V-FITC/PI após 72h de incubação com cloridrato de mitoxantrona (Evomixan®) em células tumorais caninas AXA, AXC E SH. O controle negativo (Vehicle) trata-se da utilização da água de injeção na mesma concentração do tratamento. A mitoxantrona (IC50), foi utilizada como controle positivo.

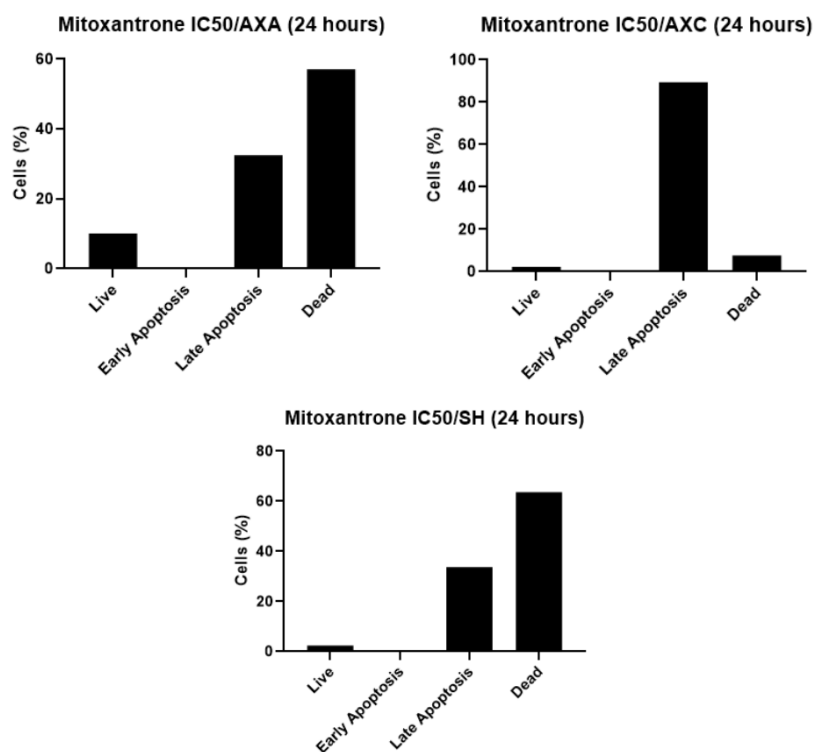


FIGURA 9- Efeito do cloridrato de mitoxantrona na indução de apoptose em células tumorais caninas AXA, AXC E SH frente a concentração do IC50, determinadas por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/PI após 24 de

incubação. Quantificação da porcentagem de células vivas, apoptose recente, apoptose tardia e necrose.

4.3. Ensaio de migração celular no sistema *transwell*

No ensaio de migração celular foi selecionada uma linhagem correspondente a cada espécie, desta forma SH canina e T24 humana. Pode-se observar que ambas apresentaram comportamentos distintos.

A linhagem SH não teve resultados significativos com relação a inibição da migração celular nos tratamentos com a curcuma e mitoxantrona. Entretanto no tratamento com a curcuma D6 a inibição foi bem pronunciada em comparação com o veículo (Figura 10). A linhagem tumoral T24 apresentou inibição da migração celular pelo teste de *transwell* com os tratamentos com a curcumina e a mitoxantrona (Figura 11).

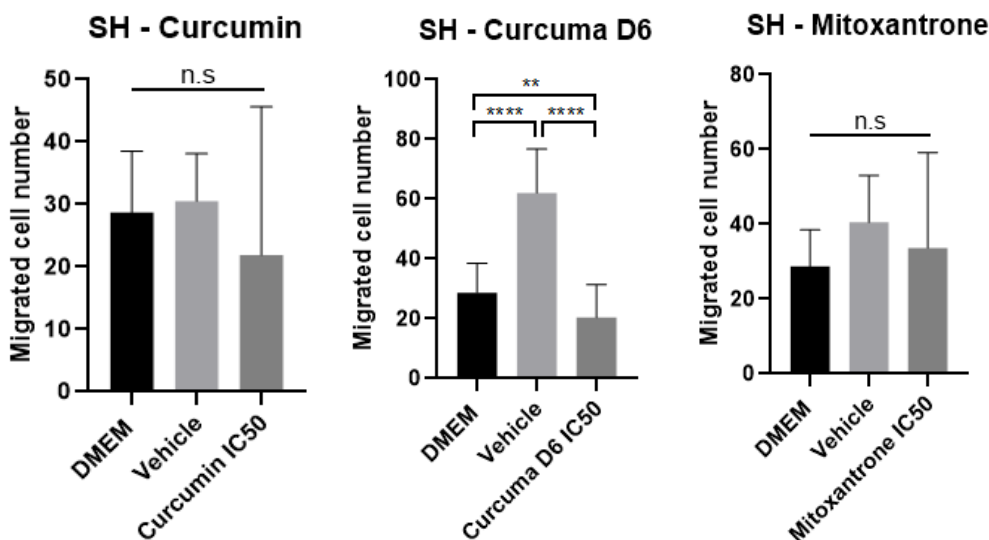


FIGURA 10- Ensaio de migração celular da linhagem canina de carcinoma urotelial de bexiga - SH tratadas com curcumina, curcuma D6 e cloridrato de mitoxantrona e seus respectivos veículos. ** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$ e n.s = $p > 0.05$.

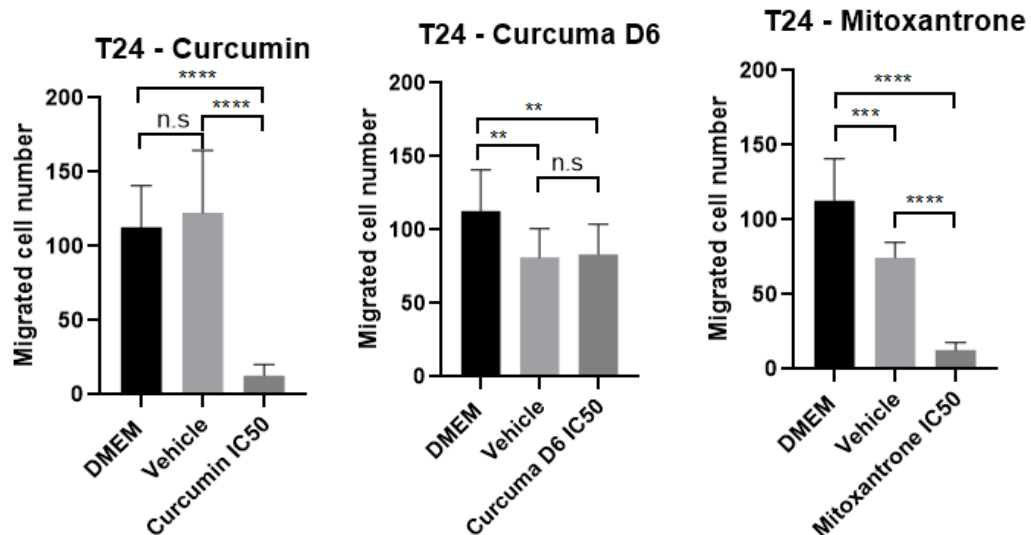
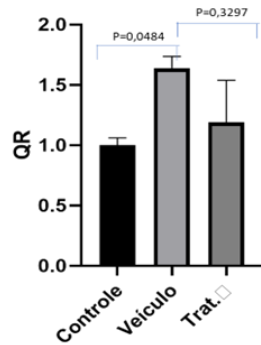
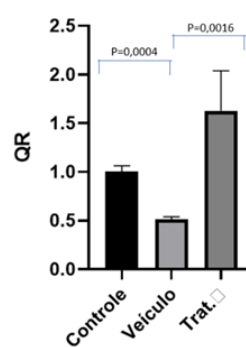
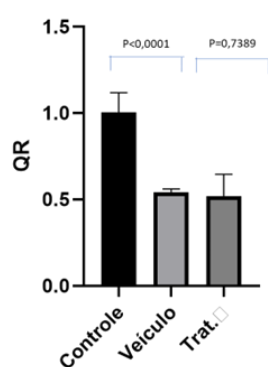
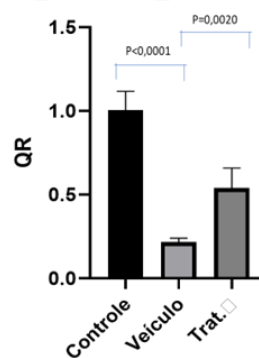
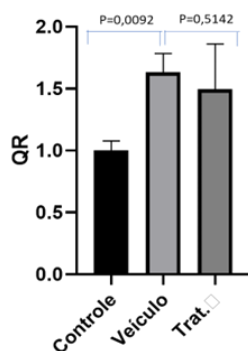
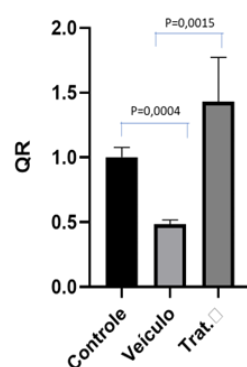
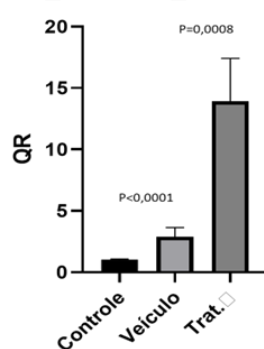
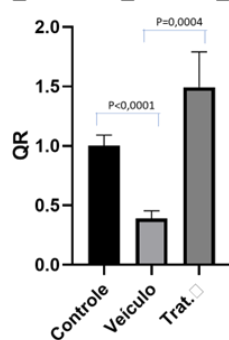


FIGURA 11- Ensaio de migração celular da linhagem humana de carcinoma urotelial de bexiga - T24 tratadas com curcumina, curcuma D6 e cloridrato de mitoxantrona e seus respectivos veículos. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$ e n.s = $p > 0.05$.

4.4. Expressão gênica e avaliação de marcadores de invasão celular

Avaliou-se a expressão gênica de genes relacionados à invasão celular (Beta1-integrina - *ITGB1*, *MMP2*, *MMP9* e *TIMP-2*), além de outros ligados à transição epitelial mesenquimal (TEM) (E-caderina - *CDH1*, *Beta catenina* e *Vimentina*). A TEM facilita o processo de invasão e metástase pela possibilidade de alteração fenotípica da célula epitelial, além de inibir a morte celular por Anoikose.

Nas três linhagens caninas, o tratamento com mitoxantrona e curcumina, aumentaram a expressão de *ITGB1*, *CDH1*, *Vimentina*, *MMP2* e *MMP9* em relação às células controle (veículo) (Figuras 12, 13 e 14).

B1_Control_Veículo_Mito**B1_Control_Veículo_Cúrcuma****B-cat_Control_Veículo_Mito****B-cat_Control_Veículo_Cúrcuma****E-cad_Control_Veículo_Mito****E-cad_Control_Veículo_Cúrcuma****VIM_Control_Veículo_Mito****VIM_Control_Veículo_Cúrcuma**

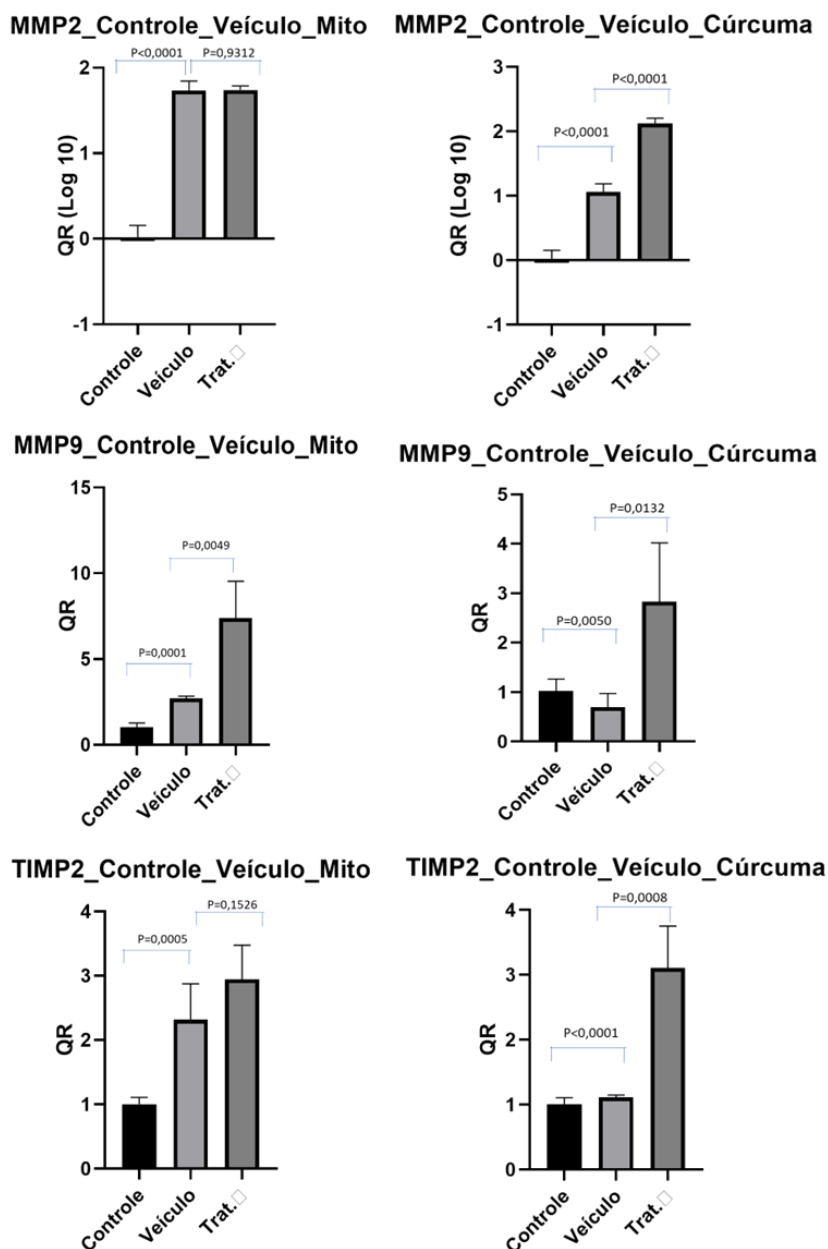
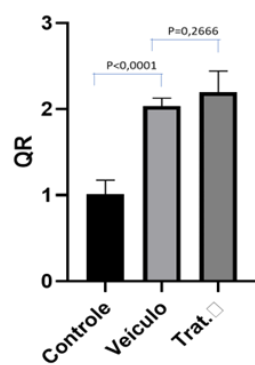
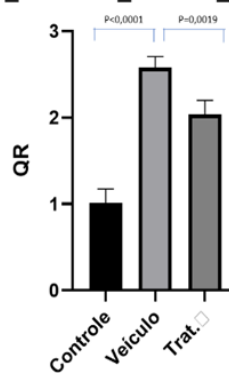
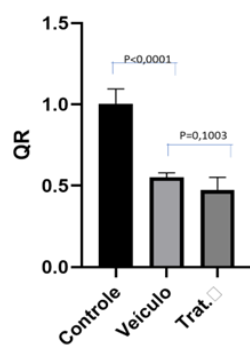
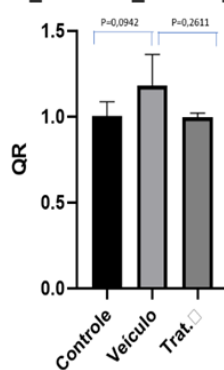
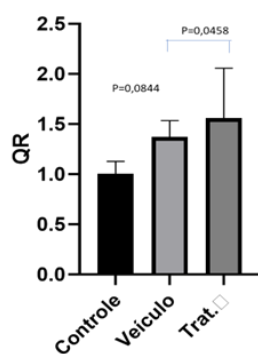
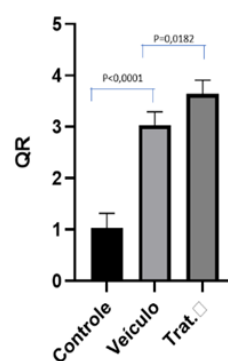
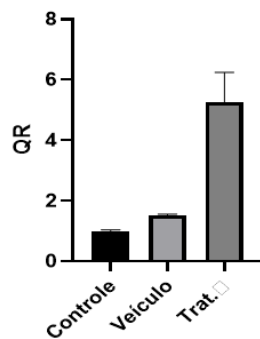
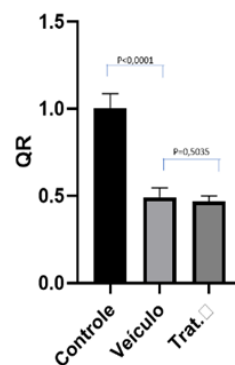


FIGURA 12- Expressão gênica de Beta-integrina (B1), Beta-catenina, CDH1 (E-caderina), Vimentina, MMP2, MMP9 e TIMP-2 em células de carcinoma urotelial canino – AXA, tratadas com Mitoxantrona ou Curcuma, em comparação com células controle (só em meio de cultura) e com veículo de diluição de cada fármaco.

B1_Control_Veículo_Mito**B1_Control_Veículo_Cúrcuma****B-cat_Control_Veículo_Mito****B-cat_Control_Veículo_Cúrcuma****E-cad_Control_Veículo_Mito****E-cad_Control_Veículo_Cúrcuma****VIM_Control_Veículo_Mito****VIM_Control_Veículo_Cúrcuma**

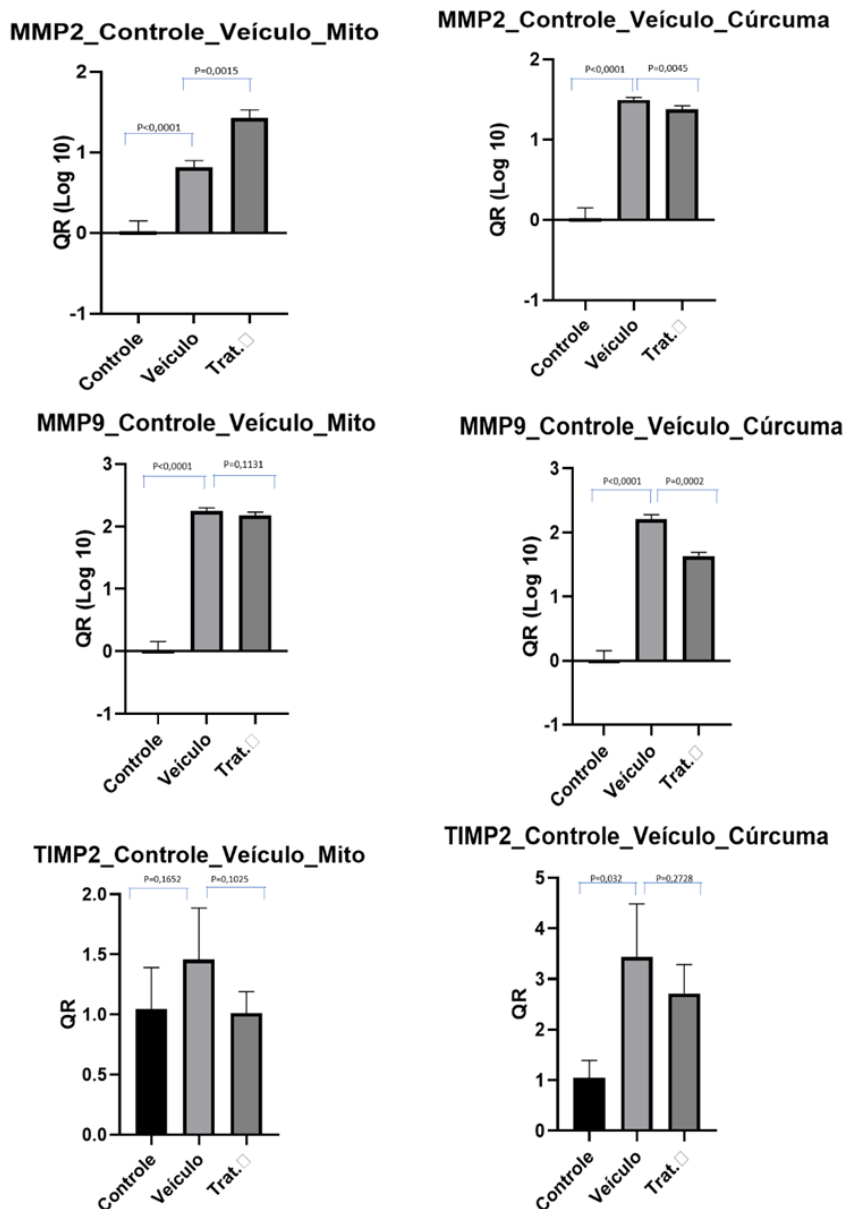
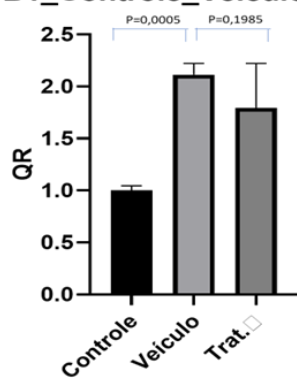
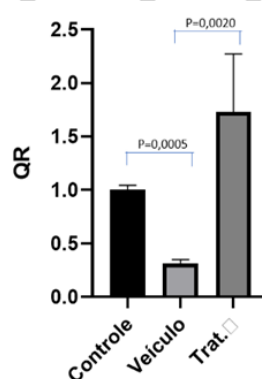
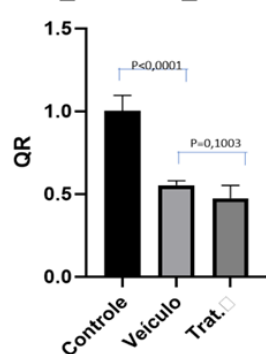
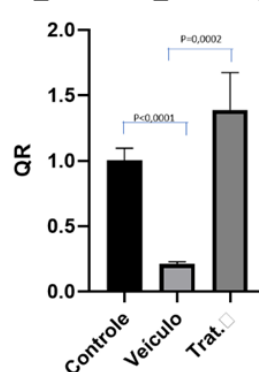
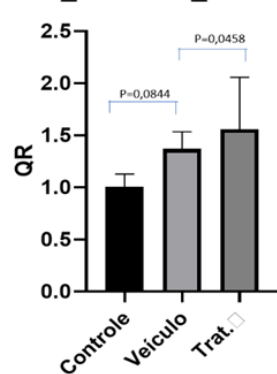
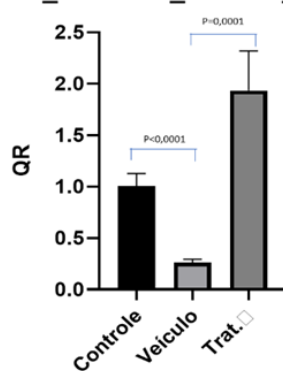
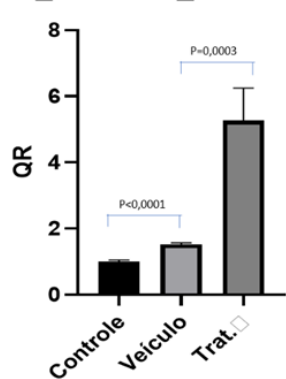
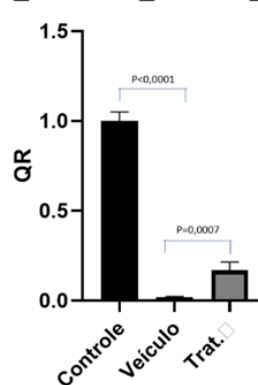


FIGURA 13- Expressão gênica de Beta-integrina (B1), Beta-catenina, CDH1 (E-caderina), Vimentina, MMP2, MMP9 e TIMP-2 em células de carcinoma urotelial canino – AXC, tratadas com mitoxantrona ou cúrcuma, em comparação com células controle (só em meio de cultura) e com veículo de diluição de cada fármaco.

B1_Control_Veículo_Mito**B1_Control_Veículo_Cúrcuma****B-cat_Control_Veículo_Mito****B-cat_Control_Veículo_Cúrcuma****E-cad_Control_Veículo_Mito****E-cad_Control_Veículo_Cúrcuma****VIM_Control_Veículo_Mito****VIM_Control_Veículo_Cúrcuma**

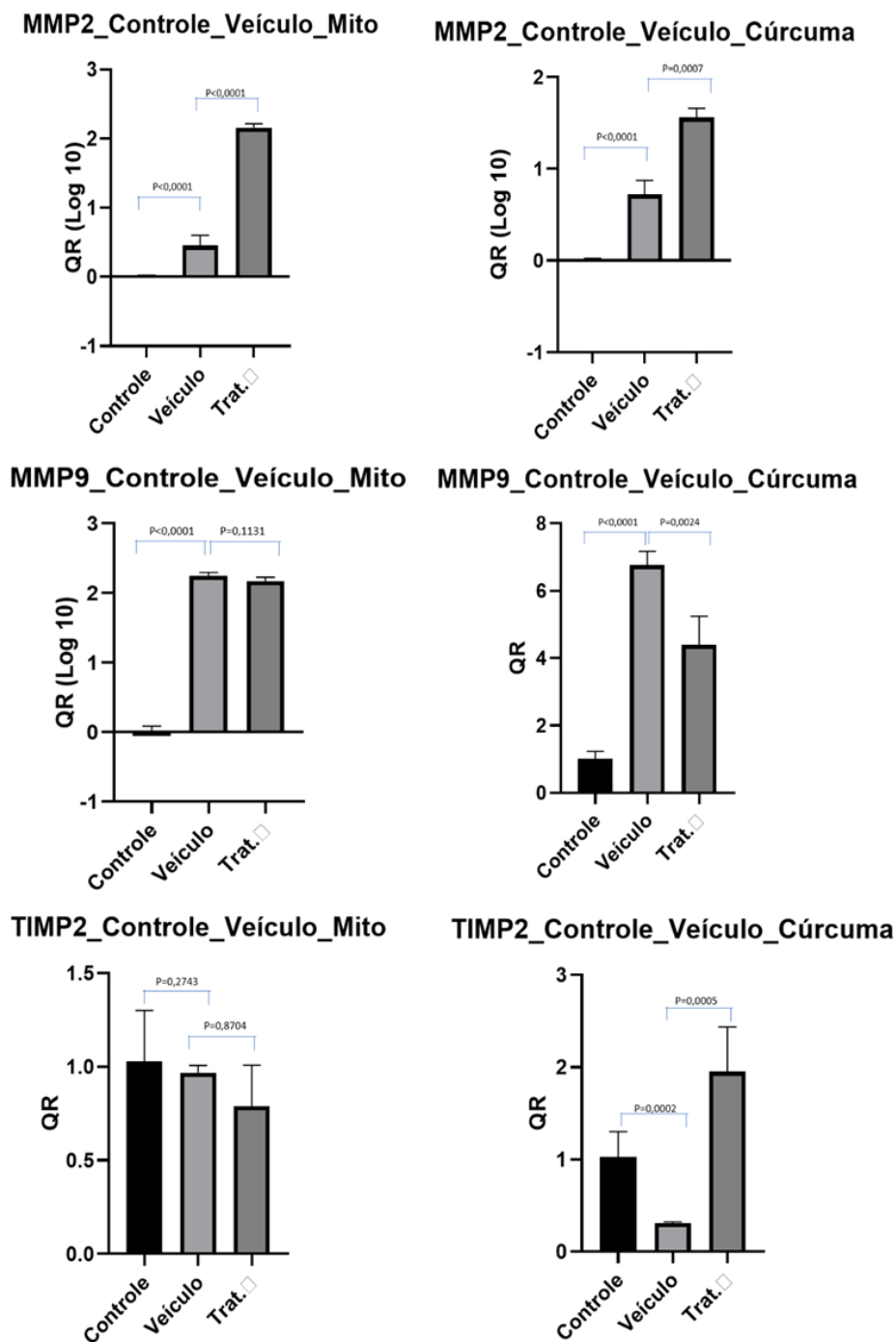


FIGURA 14- Expressão gênica de Beta-integrina (B1), Beta-catenina, CDH1 (E-caderina), Vimentina, MMP2, MMP9 e TIMP-2 em células de carcinoma urotelial canino – SH, tratadas com mitoxantrona ou cúrcuma, em comparação com células controle (só em meio de cultura) e com veículo de diluição de cada fármaco.

5. DISCUSSÃO

A busca por medicamentos naturais como forma de tratamento do câncer vem ganhando muita atenção. Muitos dos agentes quimioterápicos comumente usados são tóxicos para as células tumorais, mas também para as células normais e desencadeiam muitos efeitos colaterais. Além disso, os extratos e compostos naturais são geralmente livres de efeitos adversos e mais acessíveis (RAVINDRAN *et al.*, 2009).

O carcinoma urotelial é a neoplasia mais comum do trato urinário canino, ocorrendo com maior frequência no trígono vesical e com envolvimento da uretra prostática, o que dificulta o procedimento cirúrgico (ALLSTADT *et al.*, 2015). O tratamento quimioterápico, associado ou não a anti-inflamatórios não esteroidais (NSAID), apresenta respostas variadas de sucesso (INKOL *et al.*, 2021). Ainda os protocolos quimioterápicos de uso rotineiro melhoram os sintomas clínicos, porém a taxa de resposta e tempo de sobrevida permanecem curtos, variando de 4 a 10 meses (KOREC *et al.*, 2021). Isto encoraja a pesquisa com novos fármacos, especialmente os compostos naturais, como a cúrcuma, que podem ser associados com o protocolo quimioterápico de eleição.

Nós demonstramos que a mitoxantrona, a *Curcuma longa* D6 e a curcumina reduziram a viabilidade celular de CUB canino e humano, de uma forma dose-dependente *in vitro*. Nas linhagens caninas AXA e AXC e humana T24 tratadas por curcumina houve redução do número de células vivas, com aumento de células apoptóticas, seja tardia ou inicial, além de morte por necrose. Soares *et al.* (2020) em um estudo *in vitro* com células de osteossarcoma canino notou efeitos apoptóticos da cúrcuma mediados pelas vias JNK e cAMP/AMPK que estão envolvidas na produção das proteínas p38 e p53. Desse modo, genes relacionados à morte celular e apoptose em células de CUB canino tratados com curcumina devem ser explorados em pesquisas futuras.

A mitoxantrona já está estabelecida como um dos fármacos de escolha para o tratamento de diferentes neoplasias caninas (OGILVIE *et al.*, 1991), bem como do CUB (KNAPP *et al.*, 2014, RASTEIRO *et al.*, 2022), com melhores resultados associada ao Piroxicam, um NSAID (HENRY *et al.*, 2003). Este fármaco tem seu valor como um antibiótico antineoplásico, amplamente usado na medicina veterinária, com menores efeitos de cardiotoxicidade que a doxorrubicina.

As três linhagens caninas, tratadas com mitoxantrona, demonstraram aumento de células mortas, especialmente por apoptose tardia. Na veterinária, estudo *in vitro* a cerca deste quimioterápico são escassos e carecem de investigação, principalmente a apresentação comercial por nós estudada.

A multirresistência às drogas (MDR) pode ocorrer ao longo do tratamento quimioterápico ou as células neoplásicas já apresentarem esse fenótipo no início do tratamento. A associação de compostos naturais no tratamento de pacientes humanos pode auxiliar na reversão da quimioresistência (DARZI *et al.*, 2021). A superexpressão de proteínas transportadoras de membrana da família *ATP-binding cassette* (ABC) consistem em um dos mais importantes mecanismos de MDR (CHEN *et al.*, 2016), sendo o ABCG2 e MDR1 os membros mais importantes dessa família. As três linhagens celulares de CUB canino utilizados nesta pesquisa apresentam baixa expressão do gene *MDR1* e *ABCG2* em comparação com uma linhagem de tumor de mama canino multirresistente às drogas, estabelecida por nosso grupo de pesquisa (CRM1) (Tabela suplementar 1). A associação de produtos naturais ao protocolo quimioterápico poderia trazer resultados ainda mais relevantes em neoplasias ou linhagens multirresistentes.

A curcumina, o fenol mais importante da *Curcuma longa* tem seu efeito relatado em doenças crônicas, incluindo diferentes tipos de câncer em humanos (GIORDANO & TOMMONARO, 2019) e cães, como no estudo com linhagens de osteossarcoma canino e humano *in vitro*, onde observou-se a atividade antitumoral, redução da migração e inibição da viabilidade de células endoteliais pela curcumina encapsulada lipossômica (WITHERS *et al.*, 2017). Outro benefício da curcumina no câncer é a seletividade deste composto em matar células tumorais e preservar as células teciduais normais, além de atuar em múltiplas vias de sinalização diminuindo a probabilidade das células tumorais de desenvolver resistência (RAVINDRAN *et al.*, 2009).

A *Curcuma longa* D6 e a curcumina tiveram efeito na diminuição da invasão celular, na linhagem SH, o que demonstra que os animais podem se beneficiar do uso desses fármacos, não só pelo seu potencial de inibir o crescimento celular, mas como forma de reduzir o potencial de invasão, importante aspecto no CUB, já que aproximadamente 16% dos cães já apresentam invasão e metástase ao diagnóstico clínico (KNAPP *et al.*, 2000). Já na linhagem T24 humana, os três fármacos testados se mostraram eficientes na redução da

invasão celular.

Os resultados apresentados de expressão gênica de marcadores de transcrição epitelial mesenquimal (TEM) e invasão como as MMPs 2 e 9 e TIMP-2, devem ser interpretados no contexto de uma cultura celular em 2D (HOWE & ADDISON, 2012).

A TEM é um importante mecanismo de progressão tumoral em neoplasias de origem epitelial, relacionada à invasão e metástase. Neste processo há a transformação do fenótipo epitelial das células neoplásicas, que ganham características que conferem maior motilidade, pela perda de marcadores epiteliais, como citoqueratinas e E-caderina, e expressão de marcadores mesenquimais, como a Vimentina (DIEPENBRUCK & CHRISTOFORI, 2016). Neste sentido, Bahrami *et al.* (2019) relatam que a curcumina pode exercer um efeito inibidor do processo de TEM em diferentes tipos de neoplasias humanas como câncer oral, colorretal, tireoide e pulmão. Nas células de CUB canino, observamos um aumento de expressão de *CDH1* (E-caderina) quando tratadas com curcumina ou mitoxantrona, em relação às células tratadas com veículo somente, além da diminuição da expressão de *VIM* (vimentina) nas linhagens AXC e SH, tratadas com curcumina. O tratamento com mitoxantrona levou ao aumento da expressão gênica de vimentina nas três linhagens. Esses resultados corroboram com o potencial de reversão da TEM da curcumina, descrito por Bahrami *et al.* (2019).

Por outro lado, os marcadores de invasão *MMP2*, *MMP9* apresentaram-se com maior expressão nos dois tratamentos para as três linhagens caninas. Estes genes codificam importantes proteínas responsáveis pela degradação da matriz extracelular e consequente invasão tecidual, já descritas com aumento de expressão por imuno-histoquímica em neoplasias caninas (LOUKOPOULOS *et al.*, 2003).

O processo de TEM, invasão e metástase envolvem um grande número de vias de sinalização, além de inter-relação entre as diferentes moléculas, e por isso, estudos que ajudem a elucidar o mecanismo de ação da curcumina nesse processo devem ser realizados.

Inkol *et al.* (2021) testaram o efeito do canabidiol em três linhagens de CUB canino (AXA, Orig e SH), associado ou não a mitoxantrona e vimblastina, obtendo resultados promissores do uso isolado ou em associação deste

composto natural. Estudos como este abrem perspectivas de novas modalidades de associações de fármacos, especialmente os produtos naturais.

Nosso estudo é pioneiro no uso *in vitro* da *Curcuma longa* D6 em CUB canino e humano e curcumina em CUB canino, apresentando efeito antiproliferativo e de diminuição da migração celular. Há uma preocupação do uso *in vivo* deste composto natural, devido a sua pequena bioviabilidade nos tecidos após administração tópica ou sistêmica (FALKE *et al.*, 2018), porém com os resultados promissores obtidos, outras pesquisas podem ser realizadas para o melhor entendimento do mecanismo de ação, bem como a associação com produtos que aumentem e facilitem a sua distribuição e viabilidade.

6. CONCLUSÕES

A *Curcuma longa* D6, curcumina e mitoxantrona se mostraram eficazes na redução da viabilidade celular de cultura de carcinoma urotelial canino e humano, sendo a apoptose tardia o mecanismo de morte celular mais evidente. Ainda, observamos efeitos na redução na migração celular com o uso de *Curcuma longa* D6 na linhagem canina SH e humana T24.

Esses são os primeiros resultados do efeito da curcumina e *Curcuma longa* D6 em CUB canino e humano, porém mais pesquisas devem ser realizadas no intuito de avaliar o mecanismo de ação e forma de aplicação da curcumina, se local ou oral.

A resposta dos tratamentos avaliados não foi similar entre as três linhagens de CUB canino no que tange a expressão de genes de invasão e transição epitelial, o que pode inferir diferentes assinaturas gênicas para cada neoplasia e incentivar a conduta de tratamento personalizado.

A utilização de produtos naturais, como a curcumina, abrem novas perspectivas para o tratamento do carcinoma urotelial *in vivo*, tanto para humanos como para cães. Estudos a cerca da combinação da curcumina com os quimioterápicos de eleição para CUB canino devem ser realizados.

7. REFERÊNCIAS

- ALLSTADT, S. D. *et al.* Randomized Phase III Trial of Piroxicam in Combination with Mitoxantrone or Carboplatin for First-Line Treatment of Urogenital Tract Transitional Cell Carcinoma in Dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v.29, n.1, p. 261-267, 2015.
- ANTÔNIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTTI-PIRES, R. O. Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde. **Rev. Saúde Pública**, 48(3). P. 541-553, 2014.
- BAHRAMI, A.; MAJEED, M.; SAHEBKAR, A. Curcumin: a potent agent to reverse epithelial-to-mesenchymal transition. **Cellular Oncology**, v. 42, p. 405–421, 2019.
- BANIK, URMILA *et al.* Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p. 1-16, 2017.
- BORGES, J. *et al.* Ação antioxidante da curcumina (*Curcuma longa* L.) na ação de injúria de isquemia e reperfusão tecidual. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, 2019.
- BUBENIK, J. *et al.* Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. **International journal of cancer**, v. 11, n. 3, p. 765-773, 1973.
- CARVALHO, M. B., *et al.* Neoplasias do Sistema Urinário. In: Daleck, C. R.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. Gen Roca. Rio de Janeiro, p. 468- 471, 2016.
- CHEN, Z *et al.* Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade. **Cancer Letters**, v. 370, n. 1, p. 153–164, 2016.
- COSTA, P.I.C. **O açafão das Índias e as suas propriedades antitumorais**. 2014. 66p. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra. Disponível em: <https://eg.uc.pt/handle/10316/37758>. Acesso em 18 julho. 2022.
- D'AVILA *et al.* Anastomose ureterocolônica em um cão com carcinoma de células de transição no trígono vesical. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 159, 2016.
- DALECK, C. R., DE NARDI, A. B., RODIGHERI, S. M. & MOTTA, F. R. **Neoplasia do sistema urinário**. Roca, São Paulo, 2008.
- DARZI, S. *et al.* Improvement of cytotoxicity of mitoxantrone and daunorubicin by candidone, tephrosin, and bavachinin. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n.11, p.7105-7111, 2021.
- DE BRIYNE, Nancy *et al.* Cannabis, Cannabidiol Oils and Tetrahydrocannabinol—What Do Veterinarians Need to Know? **Animals**, v. 11, n. 3, p. 892, 2021.
- DE BROT, S *et al.* O cão como modelo animal para bexiga e carcinoma urotelial uretral: epidemiologia e histologia comparadas. **Oncology letters**, vol. 16, n. 2, p. 1641-1649, 2018.
- DHAWAN, D. *et al.* Canine invasive transitional cell carcinoma cell lines: in vitro

tools to complement a relevant animal model of invasive urinary bladder cancer. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, 2009, p. 284-292.

DIEPENBRUCK, G.; CHRISTOFORI, G. Epithelial–mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe?. **Current opinion in cell biology**, v. 43, p. 7–13, 2016.

FULKERSON, C. M., & KNAPP, D. W. Management of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs: A review. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 2, p. 217–225, 2015.

GIORDANO, A.; TOMMONARO, G. Curcumin and Cancer. **Nutrients**, V. 11, N.10, P. 2376, 2019.

HENRY, C. J. Transitional cell carcinoma. Proceedings of the 32o World Small Animal Veterinary Association. **Wsava**, Sydney, 2007.

HENRY, C.J. *et al.* Clinical evaluation of mitoxantrone and piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder carcinoma. **Clin Cancer Res.**, v. 9, n. 2, p. 906-11, 2003.

HOWE, G.; ADDISON, C. β 1 integrin An emerging player in the modulation of tumorigenesis and response to therapy. **Cell adhesion & migration**, v.6, n.2, p.71-77, 2012.

INKOL, Jordon M.; HOCKER, Samuel E.; MUTSAERS, Anthony J. Combination therapy with cannabidiol and chemotherapeutics in canine urothelial carcinoma cells. **Plos one**, v. 16, n. 8, p. e0255591, 2021.

Instituto Nacional do Câncer (2022). [O que é o câncer?]. **INCA**, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em 17 de Julho de 2022.

KNAPP, D.W. & MCMILLAN, S.K. Tumors of the Urinary System. In: **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, cap. 29, p. 572-582, 2013.

KNAPP, D.W. *et al.* Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a relevant model of human invasive bladder cancer, **Urol Oncol**, v. 5, p. 47-59, 2000.

KNAPP, D.W. *et al.* Urinary bladder cancer in dogs, a naturally occurring model for cancer biology and drug development. **ILAR J.** v. 55, p. 100 - 118, 2014.

KOREC, D. *et al.* Characterization of receptor tyrosine kinase activation and biological activity of toceranib phosphate in canine urothelial carcinoma cell lines. **BMC Veterinary Research**, v.17, n.1, p.1-13, 2021.

LIN, T. *et al.* Targeting canine bladder transitional cell carcinoma with a human bladder cancer- specific ligand. **Mol Cancer**, v. 10, n.9, 2011.

MARCHI, JULIANA PELISSARI *et al.* *Curcuma longa* L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 20, n. 3, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NAIR, K. P. **The agronomy and economy of turmeric and ginger: the**

invaluable medicinal spice crops. Newnes, 2013

OZAWA, HITOMI *et al.* Curcumin β -D-glucuronide plays an important role to keep high levels of free-form curcumin in the blood. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 1515-1524, 2017.

PRASAD, S.; TYAGI, A.K.; AGGARWAL, B. B. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. **Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association**, v. 46, n. 1, p. 2-18, 2014.

RASTEIRO, A, *et al.* Molecular Markers in Urinary Bladder Cancer: Applications for Diagnosis, Prognosis and Therapy. **Veterinary sciences**, v.9, n.3, p.107, 2022.

RAVINDRAN, J; PRASAD, S; AGGARWAL, B. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?. **The AAPS Journal**. v. 11, n.3, p. 495-510, 2009.

ROSS, M. **Histologia: texto e atlas**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

SAKAI, K., MAEDA, S., SAEKI, K. Anti-tumour effect of lapatinib in canine transitional cell carcinoma cell lines. **Vet Comp Oncol**, v.16, n.4, p.642–649, 2018.

SCHAEFER, K. *et al.* Is Science the Only Driver in Species Selection? An Internal Study to Evaluate Compound Requirements in the Minipig Compared to the Dog in Preclinical Studies. **Toxicologic Pathology**, vol. 44, n. 3, p. 474-479, 2016.

SOARES, N. *et al.* Curcumin promotes extrinsic apoptosis in canine osteosarcoma cells. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e7289109231-e7289109231, 2020.

SOMMER, B.C., DHAWAN, D., RATLIFF T.L., KNAPP D. W. Naturally- Occuring Canine Invasive Urothelial Carcinoma: A Model for Emerging Therapies. **Bladder Cancer**, v.4, p. 149- 159, 2018.

TELLES *et al.* Carcinoma de células de transição de bexiga em cão: Relato de caso. **PUBVET**. v.11, n.1, p.82-86, 2017.

WITHERS, S. *et al.* In vitro and in vivo activity of liposome-encapsulated curcumin for naturally occurring canine cancers. **Veterinary and comparative oncology**, v.16, n.4, p.571-579, 2018.

ZACHARY, J. F. & MCGAVIN, M. D. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. Elsevier Health Sciences, 2012.

ANEXO

Tabela suplementar 1: Valores de QRs para os genes *ABCG2* e *MDR1* das linhagens de carcinoma urotelial canino AXA, AXC e SH, em relação à linhagem de tumor de mama canino multirresistente às drogas (CRM1).

Linhagem	<i>ABCG2</i>	<i>MDR1</i>
AXA	0,11	0,14
AXC	0,15	0,25
SH	0,04	0,02
CRM1	1,04	0,95