



CO-TRATAMENTO COM ADRIAMICINA E CICLOFOSFAMIDA INDUZ MORTE CELULAR NA LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA DE MAMA MCF-7

Gabriel Beilfuss Rieth¹, Lucas Umpierre Conter², Jéssica Machado Miri³, Ivana Grivicich⁴

¹Aluno do Curso de Medicina da Universidade Luterana do Brasil - Bolsista FAPERGS – gabrielbeilfussid@hotmail.com; ²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde da Universidade Luterana do Brasil; ³Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde da Universidade Luterana do Brasil; ⁴ Professora do Curso de Medicina e Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde da Universidade Luterana do Brasil – grivicich@terra.com.br

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo mais comum de neoplasia no mundo, sendo mais frequente entre as mulheres. No Brasil, foi estimado 57.960 novos casos de câncer de mama em 2016.

A linhagem MCF-7 expressa quantidades substanciais de estrogênio alfa, mimetizando cânceres de mama invasivos que expressam este receptor e, portanto, justificando seu uso para estudos *in vitro*. Por ser uma neoplasia complexa, diversos tipos de tratamento incluindo o uso de antineoplásicos são cada vez mais frequentes. A Adriamicina (um antibiótico antineoplásico com grande potencial citotóxico) e a Ciclofosfamida (uma droga imunossupressora e antineoplásica) são utilizadas para tratamento de câncer de mama, porém, o seu efeito em conjunto não foi amplamente estudado. Assim, o objetivo desse experimento foi avaliar o efeito da interação entre Adriamicina e Ciclofosfamida na linhagem celular de carcinoma de mama MCF-7, a citotoxicidade dos fármacos Adriamicina e Ciclofosfamida, o índice de combinação de dose após tratamento combinado de Adriamicina e Ciclofosfamida e verificar a distribuição de células no ciclo celular após tratamento com Adriamicina e Ciclofosfamida.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada a linhagem celular de carcinoma de mama humano MCF-7. As células foram mantidas condições adequadas de cultura. A linhagem foi inoculada em placas de 96 poços e, estabilizadas por 24 h e então, tratadas por 48 h com Adriamicina e Ciclofosfamida em concentrações variando de 0 a 320 µg/mL. Após esse período, as células foram fixadas em ácido tricloroacético (TCA; 50%) e coradas com Sulfurodamina B (SRB; 0,4%).

O perfil de dose-resposta foi utilizado para derivar os valores de IC₅₀, isto é, a concentração de droga necessária para inibir 50% do crescimento celular. Os valores de IC₅₀ de cada quimioterápico foram utilizados para os testes com as combinações das drogas. Os efeitos das interações entre Ciclofosfamida e Adriamicina foram avaliados pela análise de combinação de múltiplas drogas utilizando o software CompuSyn®. Este programa permite avaliar os índices de combinações (CIs) indicando que CI < 1 indicam sinergismo, CI=1 indicam um efeito aditivo e CI>1 indicam antagonismo. Os resultados foram avaliados através das médias dos CIs atingidos com as Frações Afetadas (Fa; percentual de células mortas) e apresentados como média ± desvio padrão de 3 experimentos em triplicata. Também foi avaliado o DRI (índice de redução de dose), que indica a proporção da redução da dose de uma determinada droga, no caso da Adriamicina, em uma combinação sinérgica que proporciona o mesmo efeito comparando-se com a dose da droga isolada.

A distribuição das células nas fases do ciclo celular após os tratamentos foi determinada nas culturas através de citometria de fluxo por coloração com iodeto de propídio. Os resultados foram expressos em percentual de células por fase do ciclo celular e as células em fase sub-G1 foram consideradas células em apoptose/necrose.

RESULTADOS

Após 48 h de exposição foram avaliados os efeitos citotóxicos da Adriamicina e da Ciclofosfamida na linhagem de carcinoma de mama MCF-7 e definidos os valores de IC₅₀ (Tabela 1). A Adriamicina apresentou maior potencial citotóxico, com o IC₅₀ de 0,23 ± 0,02 µM.

Tabela 1: Valores de IC₅₀ (µM; média ± DP, n = 6) na linhagem celular de Adenocarcinoma de mama humano MCF-7 após tratamento por 72 h com Ciclofosfamida e Adriamicina

Tratamento quimioterápico	IC ₅₀ (µM)
Ciclofosfamida	179,0 ± 23,4
Adriamicina	0,23 ± 0,02
Ciclofosfamida + Adriamicina	0,09 ± 0,01*

A interação da Ciclofosfamida com a Adriamicina no co-tratamento demonstrou um IC abaixo de 1 (Tabela 2), sugerindo um efeito sinérgico entre os dois quimioterápicos. Nas maiores doses de ambos os quimioterápicos observou-se um IRD de 2,6, indicando que nesta dose o tratamento combinado pode ser reduzido 2,6 vezes sem perder seu efeito (Tabela 2).

Tabela 2: Índices de combinações (ICs), Fração afetada (FA) e Índice de Redução de Dose (IRD) (médias ± DP, n = 6) para a linhagem celular de Adenocarcinoma de mama MCF-7 tratadas com Ciclofosfamida (CICLO) e Adriamicina (ADRIA) combinados. IC < 1, = 1, ou > 1 indicam sinergismo, adição ou antagonismo, respectivamente

Antineoplásico/Doses CICLO/ADRIA (µg/mL)	FA(%)	IC(µM)	IRD
119,5/0,13	0,25	1,1	1,0
178,5/0,22	0,50	1,1	1,0
457,5/0,68	0,75	0,9	1,2
477,5/0,97	0,95	0,4	2,6

As células que foram tratadas com Adriamicina, Ciclofosfamida ou a combinação de ambos apresentaram um maior percentual de células nas fases G0/G1 e G2/M, não demonstrando diferença significativa se comparadas entre si, e também indicaram um aumento de células na fase Sub G1, se comparadas ao controle (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito do tratamento com Ciclofosfamida (CICLO) e Adriamicina (ADRIA) isolados ou combinados sobre a distribuição das células nas fases do ciclo celular linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 Os resultados estão representados como percentual de células nas fases do ciclo celular (média ± desvio padrão, n = 3)

	G0/G1(%)	S (%)	G2/M (%)	SUBG1(%)
Controle	73,3 ± 2,9	7,4 ± 2,1	13,8 ± 1,1	1,8 ± 0,4
Ciclo	37,3 ± 1,5*	10,2 ± 0,9	43,2 ± 3,1*	5,5 ± 0,03*,**
Adria	41,4 ± 1,3*	5,5 ± 0,5	43,5 ± 3,7*	4,8 ± 0,06*,**
Ciclo+Adria	38,1 ± 1,9*	7,1 ± 2,1	45,1 ± 2,5*	6,6 ± 0,7*

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos após a avaliação do efeito da Adriamicina e Ciclofosfamida em tratamentos isolados ou combinados na linhagem de câncer de mama humano MCF7 sugerem que a linhagem MCF7 apresentou maior sensibilidade a Adriamicina. Já a análise da combinação demonstrou que em maiores doses a Adriamicina combinada com a Ciclofosfamida expressou um efeito de sinergismo e, na mais alta dose, encontrou-se um maior índice de redução de dose (IRD), sugerindo que a dose de tratamento pode ser reduzida 2,6 vezes sem perder seu efeito. Na avaliação do ciclo celular, definiu-se que o tratamento com Ciclofosfamida e Adriamicina, isolados ou combinados, mostrou maior concentração de células nas fases G0/G1 e G2/M, não havendo diferenças significativas se comparadas entre si. Também houve um aumento do percentual de células na fase Sub G1, indicando um aumento de células em apoptose/necrose.