



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

Resumo

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres no Brasil e no mundo. O objetivo foi avaliar o efeito isolado e da combinação Adriamicina e Ciclofosfamida na linhagem celular de carcinoma de mama MCF-7. As células foram tratadas por 48 h com Adriamicina e Ciclofosfamida em concentrações variando de 0 a 320 µg/mL. A citotoxicidade foi avaliada pelo método colorimétrico da Sulfarodamina B e determinado os valores de IC₅₀. Foram também avaliados os efeitos das interações entre os fármacos e o IRD (índice de redução de dose). A distribuição das células no ciclo celular após os tratamentos foi determinada pela citometria de fluxo com iodeto de propídio. Os resultados após a avaliação do efeito da Adriamicina e Ciclofosfamida em tratamentos isolados ou combinados são: a linhagem MCF7 apresentou maior sensibilidade a Adriamicina. Em relação à análise de combinação, demonstrou-se que em maiores doses a Adriamicina combinada com a Ciclofosfamida apresenta um efeito sinérgico. Na maior dose encontrou-se um IRD de 2,6 vezes. Na avaliação do ciclo celular, foi observado que todos os tratamentos levaram a um aumento de células nas fases G2/M quando comparados com o grupo controle. Também houve um aumento do percentual de células na fase Sub-G1, indicando um aumento de células em apoptose/necrose. Assim, os resultados sugerem que a combinação da Ciclofosfamida com Adriamicina apresentam um efeito sinérgico em doses elevadas e que este efeito pode ser explicado por um aumento na indução de morte celular.

Palavras-chave: Câncer de mama, Adriamicina, Ciclofosfamida, MCF-7, citotoxicidade.

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 (INCA, 2016). A grande maioria de casos de câncer de mama se origina no epitélio ductal, enquanto a minoria tem origem no epitélio lobular. Têm-se documentado diversos fatores de risco, tais como a ingestão de álcool, nuliparidade, terapia de reposição hormonal, idade avançada, tempo de exposição hormonal e o uso de contraceptivos orais (CDC, 2016). O diagnóstico nos estágios iniciais se dá pelo autoexame das mamas, usado para identificação da presença de pequenos nódulos; outro método, este mais específico é a mamografia, na qual se tem a visão interna do seio em diferentes ângulos, permitindo a detecção precoce do câncer por poder identificar pequenas lesões em fases iniciais. Cinco tipos de tratamentos padrões são usados para o câncer de mama, que são: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia alvo (THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017).

1 Aluno do curso de graduação de Medicina – Bolsista PROBITI/FAPERGS – gabrielbeilfussid@hotmail.com

2 Aluno do PPPGBIOSAÚDE – Bolsista CAPES – lconter@gmail.com

3 Aluno do PPPGBIOSAÚDE – Bolsista CAPES – jejemiri@hotmail.com

4 Professor do curso de Medicina e do PPGGBIOSAÚDE – grivicich@terra.com.br

A Adriamicina, também conhecida como Doxorubicina, é um quimioterápico classificado como antibiótico antineoplásico pertencente ao grupo das antraciclinas (MA et al., 2013). Possui grande potencial citotóxico e é utilizado no tratamento de diversos tipos de neoplasias. Seu principal mecanismo de ação ocorre pela inibição da transcrição, síntese e replicação do DNA, mas também pela geração de espécies reativas de oxigênio. A Adriamicina estabiliza a topoisomerase-II após a quebra da cadeia de DNA durante a replicação, prevenindo a liberação da fita dupla e com isso impedindo a replicação (POMMIER et al., 2010). Pode ocorrer também, uma ativação nas vias de apoptose quando ocorre uma falha na tentativa de reparo do DNA, e o crescimento celular é inibido nas fases G1 e G2 (CABEZA et al., 2015).

Já a Ciclofosfamida é um agente alquilante, pertencente à classe das oxazafosfarinas. Possui limitação quando usada como quimioterápico, pois pode prejudicar o tecido normal além do intenso efeito cardiotoxico. Um fator importante para avaliação dos efeitos terapêuticos e tóxicos da Ciclofosfamida é a necessidade de ativação metabólica pelo citocromo hepático microsomal P450. Mostarda fosforamida e Acroleína são os dois metabólitos ativos da Ciclofosfamida. Os efeitos antineoplásicos da Ciclofosfamida estão ligados à mostarda Fosforamida, enquanto que a Acroleína está ligada aos efeitos tóxicos (SENTHILKUMAR et al., 2006). Por ser um agente alquilante, atua ligando-se a base guanina do DNA, no átomo de nitrogênio de número 7 do anel imidazólico induzindo a inibição da replicação do DNA, levando a morte celular (CHIGHIZOLA et al., 2011).

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da interação entre Ciclofosfamida e Adriamicina na linhagem celular de carcinoma de mama MCF-7, a citotoxicidade dos fármacos isolados e combinados, o índice de combinação de dose após tratamento combinado e verificar a distribuição de células no ciclo celular após tratamento com Adriamicina e Ciclofosfamida isolados e combinados.

METODOLOGIA

Foi utilizada a linhagem celular de carcinoma de mama humano MCF-7, adquirida da *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, EUA). As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² com meio de cultura RPMI-1640 contendo L-glutamina 2% (p/v) e soro fetal bovino 10% (v/v) em condições adequadas de cultura. A linhagem celular 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%), coradas com Sulfurodamina B (SRB; 0,4%) e avaliados em um comprimento de onda de 540 nm usando um leitor de microplacas (SKEHAN et al., 2015). 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, quando comparada aos controles sem droga. Os valores de IC₅₀ de cada quimioterápico foram utilizados para os testes com as combinações das drogas.

Os efeitos da interação 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), onde: CI < 1 indica sinergismo, CI=1 indica um efeito aditivo e CI>1 indica antagonismo. Os resultados foram avaliados através das médias dos CIs atingidos com as Frações Afetadas (Fa = percentual de células mortas) de 0,25, 0,50, 0,75, 0,90 e 0,95; 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 (CHOU, 2010).

A distribuição das células nas fases do ciclo celular foi determinada nas culturas através de citometria de fluxo por coloração com iodeto de propídio utilizando o citômetro de fluxo

Accuri C6. 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 (NICOLETTI et al., 1991).

As análises estatísticas foram realizadas com a análise de variância de uma via com o teste post hoc de Dunnett's ou teste t de Student, conforme a situação apresentada. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os testes foram realizados no software Graphpad Prism®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 IC_{50} (Tabela 1). A Adriamicina apresentou maior potencial citotóxico que a ciclofosfamida. Esses dados estão de acordo com estudo anterior na linhagem celular MCF-7, que evidenciou um IC_{50} de $0.1636 \pm 0.038 \mu\text{M}$ (POTUCKOVA et al., 2014).

Tabela 1: Valores de IC_{50} (μM ; média \pm DP, $n = 6$) na linhagem celular de Adenocarcinoma de mama humano MCF-7 após tratamento por 48 h com Ciclofosfamida e Adriamicina.

Tratamento quimioterápico	IC_{50} (μM)
Ciclofosfamida	$179,0 \pm 23,4$
Adriamicina	$0,23 \pm 0,02$
Ciclofosfamida + Adriamicina	$0,09 \pm 0,01^*$

*Diferente da Adriamicina isolada ($p < 0,05$).

Avaliou-se, também, a combinação entre os antineoplásicos de interesse, onde foi definido o índice de combinações (CI), que indica se houve sinergismo, adição ou antagonismo, e o índice de redução de dose (IRD), que estima quantas vezes a dose combinada pode ser reduzida para atingir um efeito comparável com o efeito obtido com os agentes individuais. O co-tratamento da Ciclofosfamida com a Adriamicina 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 \pm 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 ($\mu\text{g/mL}$)	FA	IC	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

Em um estudo sobre aumento de atividade antitumoral após a combinação de determinados antineoplásicos na linhagem de carcinoma renal A498, definiu que interação entre a Adriamicina com o Tiofeno em diferentes doses, apresentam um efeito de sinergismo e um elevado índice de combinação de dose (HONGRAPIPAT et al., 2008). TSAKALOZOU et al. (2012), após avaliar a combinação de Adriamicina com Docetaxel nas linhagens de câncer de próstata PC3 e DU145, determinaram que após combinação ocorre um efeito sinérgico na linhagem PC3, já na linhagem DU145 esse efeito foi limitado a concentrações específicas.

Os resultados da distribuição das células no ciclo celular (Tabela 3) demonstraram que no controle não tratado o maior percentual de células se encontrava na fase G0/G1 e um pequeno percentual encontrava-se na fase Sub G1, que representa fração de células onde ocorreu fragmentação de DNA, indicativo de células em apoptose/necrose, ao passo que nas 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, também indicaram um aumento de células na fase Sub G1, se comparadas ao controle.

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 \pm desvio padrão, n = 3).

	G0/G1(%)	S (%)	G2/M (%)	SUBG1 (%)
CONTROLE	73,3 \pm 2,9	7,4 \pm 2,1	13,8 \pm 1,1	1,8 \pm 0,4
CICLO	37,3 \pm 1,5*	10,2 \pm 0,9	43,2 \pm 3,1*	5,5 \pm 0,3***
ADRIA	41,4 \pm 1,3*	5,5 \pm 0,5	43,5 \pm 3,7*	4,8 \pm 0,6***
CICLO+ADRIA	38,1 \pm 1,9*	7,1 \pm 2,1	45,1 \pm 2,5*	6,6 \pm 0,7*

*Diferente do controle (p<0,05); **Diferente do tratamento isolado (p < 0,05).

Nossos achados estão de acordo com estudo utilizando a linhagem MCF7 que demonstrou que estas células, em condições normais, apresentam maior percentual na fase G0/G1 do ciclo celular (PATEL et al., 2015). Em estudo avaliando os efeitos da Adriamicina nas linhagens MCF-7 e NIH3T3 foi demonstrado resultados semelhantes ao que encontramos em nosso trabalho, o controle apresentou um valor de aproximadamente 70% de células em fase G0/G1. Também demonstrou uma redução do percentual de células na fase G0/G1 e um aumento do número de células nas fases S e G2/M (TOMANKOVA et al., 2015). Em outro estudo foi observado na linhagem de carcinoma de cólon humano HCT-116, após tratamento com Adriamicina, parada na fase G2/M do ciclo celular e aumento em células na fase Sub G1 (LUPERTZ et al., 2010). Em outro estudo com a linhagem MCF7 a Ciclofosfamida, levou a um atraso na progressão da fase S e parada na fase G2/M, possivelmente consequência de ligações cruzadas no DNA (CHEN et al., 1996).

CONCLUSÕES

Nossos resultados com o co-tratamento com Adriamicina e Ciclofosfamida na linhagem de câncer de mama humano MCF7 sugerem que em maiores doses a Adriamicina combinada com a Ciclofosfamida tiveram um efeito de sinergismo, além de que ainda é possível reduzir a dose dos quimioterápicos em 2,6 vezes sem perder seu efeito. Além disso, esse efeito sinérgico parece estar associado com uma maior indução de apoptose/necrose.

REFERÊNCIAS

- CABEZA, L.; ORTIZ, R.; ARIAS, J.L.; PRADOS, J.; RUIZ MARTINEZ, M.; ENTRENA, J.M.; et al. Enhanced antitumor activity of doxorubicin in breast cancer through the use of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 1291-1306, 2015.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). What Are the Risk Factors for Breast Cancer?. EUA. 2016 [acesso em 2017 Maio 20]. Disponível em: http://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm
- CHEN, L.; WAXMAN, D.J.; CHEN, D.; KUFEL, D.W. Sensitization of human breast cancer cells to cyclophosphamide and ifosfamide by transfer of a liver cytochrome P450 gene. *Cancer Research*, v. 56, p. 1331–1340, 1996.

CHIGHIZOLA, C.; ONG, V.H.; DENTON, C.P. Cyclophosphamide as Disease - modifying Therapy for Scleroderma. *International Journal of Clinical Rheumatology*, v. 6, p. 219-230, 2011.

CHOU, T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Research*, v. 70, p. 440-446, 2010.

HONGRAPIPAT, J.; KOPECKOVÁ, P.; PRAKONGPAN, S.; KOPECEK, J. Enhanced antitumor activity of combinations of free and HPMA copolymer-bound drugs. *International Journal of Pharmacy*, v. 351, p. 259-270, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro. 2016 [acesso em 2017 Mai 1]. Disponível em: <http://www.inca.org.br>

LÜPERTZ, R.; WÄTJEN, W.; KAHL, R.; CHOVOLOU, Y. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology*, v. 271, p. 115-121, 2010.

MA, P.; MUMPER, R.J. Anthracycline Nano-Delivery Systems to Overcome Multiple Drug Resistance: A Comprehensive Review. *Nano Today*, v. 8, p. 313-331, 2013.

NICOLETTI, L.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, v. 139, p. 271-279, 1991.

PATEL, P.B.; THAKKAR, V.R.; PATEL, J.S. Breast Cancer Cellular Effect of Curcumin and Citral Combination on Breast Cancer Cells: Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *Journal of Breast Cancer*, v. 18, p. 225-234, 2015.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chemistry and Biology*, v. 17, p. 421-433, 2010.

POTUCKOVA, E.; JANSOVA, H.; MACHACEK M, VAVROVA A, HASKOVA P, TICHOTOVA L. Quantitative analysis of the anti-proliferative activity of combinations of selected iron-chelating agents and clinically used anti-neoplastic drugs. *PLoS One*, v. 9, p. 87-89, 2014.

SENTHILKUMAR, S.; YOGEEETA, S.K.; SUBASHINI, R.; DEVAKI, T. Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats. *Chemico-biological Interaction*, v. 160, p. 252-260, 2006.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SLADEK, N.E. Metabolism of cyclophosphamide by rat hepatic microsomes. *Cancer Research*, v. 31, p. 901-908, 1971.

THE NATIONAL CANCER INSTITUTE. Breast Cancer Treatment for health professionals (PDQ®). EUA. 2015 [acesso em 2017 Mai 1]. Disponível em: http://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq#section/_1

TOMANKOVA, K.; POLAKOVA, K.; PIZOVA, K.; BINDER, S.; HAVRDOVA, M.; KOLAROVA, M. In vitro cytotoxicity analysis of doxorubicin-loaded/superparamagnetic iron oxide colloidal nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 cell lines. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 949-961, 2015.

TSAKALOZOU, E.; ECKMAN, A.M.; BAE, Y. Combination effects of docetaxel and Doxorubicin in hormone-refractory prostate cancer cells. *Biochemistry Research International*, v. 2012, p. 832059, 2012.