



Efeitos Citotóxico, Genotóxico e Mutagênico da Associação da Selenocistina com 5-Fluorouracil ou Oxaliplatina na Linhagem Celular de Adenocarcinoma de Mama MCF-7

Lucas Umpierre Conter¹, Jesse Franklin da Silveira², Iuri Marques de Oliveira³, João Antônio Pegas Henriques⁴, Renato Moreira Rosa⁵, Ivana Grivicich⁶

¹Acadêmico do curso de Biomedicina, Iniciação Científica CNPq no Laboratório de Biologia do Câncer, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA; ²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA; ³Centro de Biotecnologia da UFRGS; ⁴Centro de Biotecnologia da UFRGS; ⁵Centro de Biotecnologia da UFRGS; ⁶Professora do Curso de Biomedicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Coordenadora do Laboratório de Biologia do Câncer, ULBRA

E-mail: lconter@gmail.com

INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa uma das principais causas de morte entre as mulheres em todo o mundo.

Apesar dos avanços terapêuticos no desenvolvimento dos fármacos antineoplásicos, a utilização destes agentes pode exercer efeitos tóxicos, interferindo nas funções do DNA e RNA.

O 5-Fluorouracil (5-FU) e a Oxaliplatina (OXL), em associação com outros fármacos, têm sido escolhidos, em muitos casos, para o tratamento do câncer de mama.

Com o objetivo de melhorar as respostas terapêuticas, a Selenocistina (SEL), molécula organoselenada, pode ser utilizada como componente anticancerígeno.

OBJETIVO

Avaliar o efeito do pré-tratamento com selenocistina na resposta proliferativa e na estabilidade genômica da linhagem celular derivada de adenocarcinoma de mama humano - MCF7 - submetidas à 5-fluorouracil e oxaliplatina.

MATERIAIS E MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

Utilizou-se a linhagem celular derivada de adenocarcinoma de mama humano MCF-7.

As células foram cultivadas em condições padrões em meio de Dulbecco, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado mantidos a 37°C.

DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

As células foram semeadas em placas de cultivo de 24 e incubadas durante 24 horas a 37°C. Inicialmente as células foram expostas à 5-FU e OXL nas concentrações variando entre 1-100 µmol/L e à SEL concentrações variando entre 0,1-100 µmol/L e incubadas durante 24 horas.

Após as células foram plaqueadas em densidade de 500 células por poço e o crescimento foi acompanhado ao microscópio e cada colônia continha no mínimo 50 células durante 14 dias. A sobrevivência celular foi calculada como porcentagem relativa ao grupo controle negativo. A partir desses resultados escolhemos doses citotóxicas para 5-FU e OXL e sub-citotóxica para SEL.

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE

O efeito genotóxico da combinação 5-FU, OXL e SEL foi avaliado pelo teste de cometa alcalino após 24 h de tratamento.

Os resultados foram expressos como índice e frequência de danos de danos no DNA.

DETERMINAÇÃO DA MUTAGENICIDADE

O efeito mutagênico da combinação 5-FU, OXL e SEL foi avaliado pelo teste de micronúcleo em células binucleadas, expostas a citocalasina B por 21 horas. Os micronúcleos foram identificados e contados em 2.000 células binucleadas com citoplasma bem preservado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas para comparar os danos observados pelos ensaios clonogênico, ensaio cometa e teste de micronúcleos foram realizados pelo teste ANOVA de duas vias, seguido pelo pós teste de Tukey. Valores de p < 0,05 e p < 0,01 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

O tratamento com SEL em concentrações não-citotóxicas (5 µmol/L a 50 µmol/L) foi capaz de potencializar a ação genotóxica do tratamento com 5-FU e OXL, efeito este que pode ser visualizado pela redução da sobrevivência celular (Figura 1).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUL-HASSAN KS, LEHNERT BE, GUANT L, WALMSLEY R. Abnormal DNA repair in selenium-treated human cells. Mutation Research, 2004; 565: 45-51
- ARRONDEAU J, GAN KH, RAZAK ARA, PAOLETTI X, LE TOURNEAU C. Development of Anti-cancer Drugs. Discovery Medicine, 2010; 10: 355-362.

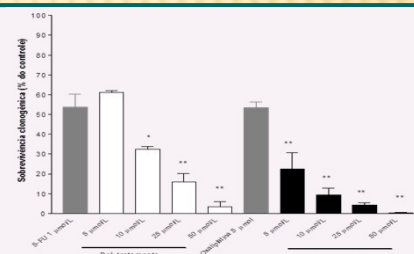


Figura 1 - Efeito do pré-tratamento com SEL na citotoxicidade do 5-FU e OXL. Os experimentos foram expressos como média ± DP em relação ao controle (n = 6). *significativamente diferente de células expostas apenas ao 5-FU ou OXL (p < 0,05); **significativa diferente de células expostas apenas ao 5-FU ou OXL (p < 0,01).

O 5-FU (1 µmol/L) e OXL (5 µmol/L), isoladamente, induziram lesões detectáveis pelo ensaio cometa às células MCF-7 (elevado índice de danos e grande número de células contendo lesões ao material genético, conforme mostrado na frequência de danos), além de efeito mutagênico (altas taxas de micronúcleos), conforme Tabela 1.

O pré-tratamento com SEL em concentrações não-citotóxicas (25 µmol/L a 50 µmol/L) foi capaz de potencializar a ação genotóxica do tratamento com 5-FU e OXL (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do pré-tratamento com selenocistina (SEL) na toxicidade genética do 5-FU e OXL na linhagem celular MCF-7.

Tratamento	Ensaio cometa		Teste de micronúcleos	
	Índice de danos	Frequência de danos	Proliferação celular (% células binucleadas)	Micronúcleos a cada 2.000 células binucleadas
MMS 40 µmol/L	175,0 ± 21,0**	78,4 ± 9,0**	21,8 ± 12,0*	115,7 ± 18,0*
Controle negativo	21,4 ± 6,0	16,0 ± 0,7	91,5 ± 4,0	13,5 ± 2,0
5-FU				
5-FU 1 µmol/L	94,2 ± 5,0**	71,8 ± 6,0**	68,7 ± 11,0**	29,9 ± 3,2**
SEL 5 µmol/L + 5-FU	80,4 ± 3,7	63,7 ± 2,0	60,7 ± 1,8	42,8 ± 16,0
SEL 10 µmol/L + 5-FU	121,9 ± 15,0	72,8 ± 3,0	29,9 ± 4,0*	50,1 ± 8,0
SEL 25 µmol/L + 5-FU	168,0 ± 9,0**	80,7 ± 9,0*	12,7 ± 2,6**	60,7 ± 5,1*
SEL 50 µmol/L + 5-FU	185,3 ± 25,6**	92,8 ± 4,0**	3,8 ± 0,9**	72,0 ± 4,5**
Oxaliplatina				
OXL 5 µmol/L	58,1 ± 3,9*	82,4 ± 13,0**	61,8 ± 7,6**	48,5 ± 6,1**
SEL 5 µmol/L + OXL	39,1 ± 0,1	60,1 ± 0,2*	20,7 ± 8,8**	30,7 ± 6,0
SEL 10 µmol/L + OXL	43,7 ± 3,0	89,0 ± 12,0	9,7 ± 2,4**	42,2 ± 8,3
SEL 25 µmol/L + OXL	54,8 ± 2,6**	91,6 ± 3,0*	5,0 ± 0,8**	75,0 ± 14,0**
SEL 50 µmol/L + OXL	88,4 ± 21,8**	96,5 ± 11,0*	1,4 ± 0,2**	91,5 ± 20,7**

Os experimentos foram expressos como média ± DP em relação ao controle (n = 3). O símbolo * representa p<0,05 e o símbolo ** representa p<0,01 conforme testado por ANOVA (Tukey test). Tratamentos com selenocistina foram comparados com células apenas expostas ao agente mutagênico. O tratamento mutagênico foi comparado de encontro ao respectivo controle mutagênico.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o pré-tratamento com SEL favorece a ação citotóxica do 5-FU e OXL em carcinoma de mama, sendo uma opção interessante para novos estudos.