

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DA COMBINAÇÃO DE PIOGLITAZONA E INFRA DOSES DE DOXORRUBICINA

Sandrielle Maria da Silva¹

Victor Queiroz de Arruda²

Thâmara Onofre de Melo³

Thaysa Onofre de Melo⁴

André Luiz de Souza Barros⁵

Odontologia



ISSN IMPRESSO 1980-1785

ISSN ELETRÔNICO 2316-3143

RESUMO

O termo neoplasia pode ser definido como uma massa anormal de tecido, cujo crescimento é excessivo e não coordenado com aquele dos tecidos normais, persistindo da mesma maneira excessiva após a interrupção do estímulo que originou as alterações celulares e teciduais. A quimioterapia antineoplásica é o tratamento que utiliza agentes químicos com a finalidade de destruir as células cancerígenas ou inibir o seu crescimento e proliferação. O regime de quimioterapia é o plano de tratamento para o câncer, determinado pelo médico oncologista ou hematologista. A Doxorubicina é um agente quimioterápico do grupo das Antraciclinas, é um importante componente de diversos regimes quimioterápicos para vários tipos de tumores. Vários estudos tem associado a utilização da Pioglitazona, um derivado Tiazolidinediônico usado no tratamento do Diabetes, a inúmeros efeitos anticâncer. Nessa pesquisa nós avaliamos os efeitos da associação da pioglitazona com baixas doses de doxorubicina.

PALAVRAS-CHAVES

Câncer; Pioglitazona; Doxorubicina.

ABSTRACT

The term neoplasm can be defined as an abnormal mass of tissue, whose growth is excessive and not coordinated with that of normal tissues, persisting in the same exces-

sive way after the interruption of the stimulus that originated the cellular and tissue changes. Antineoplastic chemotherapy is the treatment that uses chemical agents for the purpose of destroying cancer cells or inhibiting their growth and proliferation. The chemotherapy regimen is the treatment plan for cancer as determined by the oncologist or hematologist. Doxorubicin is a chemotherapeutic agent of the Anthracyclines group, is an important component of several chemotherapeutic regimens for various types of tumors. Several studies have associated the use of Pioglitazone, a thiazolidinedione derivative used in the treatment of Diabetes, to numerous anticancer effects. In this study we evaluated the effects of the association of pioglitazone with low doses of doxorubicin.

KEYWORDS

Cancer. Pioglitazone. Doxorubicin.

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de um clone de células, que invadem tecidos e órgãos. O tratamento do câncer depende das características específicas do tumor, da sua localização, tamanho e presença ou não de doença à distância (metástases). A quimioterapia antineoplásica é o tratamento que utiliza agentes químicos com a finalidade de destruir as células cancerígenas ou inibir o seu crescimento e proliferação.

O regime quimioterápico pode ser indicado no tratamento pré-operatório, chamado neoadjuvante, ou pós-operatório, chamado adjuvante, bem como para fim paliativo. Tal tratamento comumente inclui um componente da classe das Antraciclinas, como a doxorubicina (GOLDHIRSCH et al., 2007). Visando a individualização terapêutica, a dosagem de doxorubicina é atualmente estabelecida com base na área de superfície corpórea, embora estudos clínicos mostrem melhor correlação entre o metabolismo da doxorubicina e idade polimorfismo das enzimas metabolizadoras e gordura abdominal (LAL et al., 2008; WONG et al., 2014)

A toxicidade mais comum é gastrointestinal, com vômitos, diarreia e anorexia que ocorrem de três a cinco dias após a aplicação. A toxicidade miocárdica é bem conhecida e eventualmente são relatados episódios de arritmia durante a aplicação. Tem sido demonstrado que a doxorubicina causa o aumento da liberação periférica de histamina, um efeito dose-relacionado e associado à infusão rápida. Os sinais clínicos da liberação de histamina são prurido, urticária, eritema e vômito. (MARTINS et al., 2012).

A Pioglitazona, um derivado Tiazolidinediônico usado para tratamento Diabetes Mellitus tipo II (não insulino-dependente) atua, estimulando seletivamente os receptores dos proliferadores peroxissomais gama (PPAR γ). Ela age em tecidos-alvo para a insulina, tais como tecido adiposo, músculos esqueléticos e fígado. A ativação do receptor PPAR γ regula a transcrição de genes envolvidos no controle da produção, transporte e utilização de glicose (PADDOCK et al., 2007).

Com relação ao câncer tanto os PPARs como os ácidos graxos estão implicados na regulação do ciclo celular, diferenciação e apoptose (ROSEN, 2001 apud BARROS, 2010). As propriedades na indução de apoptose e de diferenciação celular do PPAR γ propiciam efeitos benéficos importantes nos tratamentos de diferentes tumores, incluindo carcinomas de mama, cólon, próstata, pâncreas, câncer das vias biliares, hipófise e gástricos, tanto nos tratamentos *in vivo* como *in vitro* (KOEFFLER, 2003; HEANEY, 2004 apud BARROS, 2010).

Embora um grande número de pesquisas descrevam os mecanismos de ação induzidos pelo tratamento com TZDs, a base molecular para sua ação antitumoral permanece incompletamente elucidada. Sabe-se, a partir dos estudos já existentes, que a apoptose e a diferenciação celular são os principais mecanismos relacionados à ativação do PPAR γ em células cancerígenas (BLANQUICETT; RAMON; MICHAEL, 2008 apud BARROS, 2010).

Nesta pesquisa nós avaliamos os efeitos *in vitro* da associação da pioglitazona com baixas doses de doxorrubicina com o objetivo de reduzir os efeitos adversos promovidos pela quimioterapia usando doxorrubicina.

2 METODOLOGIA

2.1 FÁRMACOS

A Pioglitazona e a doxorrubicina foram obtidos de Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA.

2.2 CÉLULAS

As linhagens de células humanas utilizadas foram: K562 (eritroleucemia), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão), HEP-2 (carcinoma epidermóide de laringe), HL-60 (leucemia promielocítica), MCF-7 (câncer de mama) mantidas no laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos. As linhagens utilizadas foram mantidas em DMEM – Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (Sigma Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

2.3 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS

A determinação das concentrações inibitórias médias (CI₅₀) das amostras foi realizada por meio do método colorimétrico do MTT. As células tumorais (K562, NCI-H292, HEP-2, HL-60 e MCF-7) foram semeadas (2 x 10⁵ células x poço⁻¹) em placas de 96 poços (BD/Labware®). Em seguida as substâncias previamente dissolvidas em DMSO, foram diluídas em série no meio DMEM para obtenção das concentrações

(0,048 - 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e adicionadas em placas de 96 poços (100 μL . Poço $^{-1}$). A doxorubicina foi utilizada como padrão.

Após 72h de contato das células com os compostos, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 150 μL de solução de MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)] (Sigma-Aldrich®) na concentração de 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. As placas foram deixadas por 3h em estufa 37°C e ao final desse período, 150 μL de DMSO foi adicionado a cada poço para a dissolução dos cristais de formazam. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Modelo 3550 BIO-RAD, Inc.) no comprimento de onda de 560nm e o efeito dos compostos foi quantificado pela comparação com a absorbância do grupo controle.

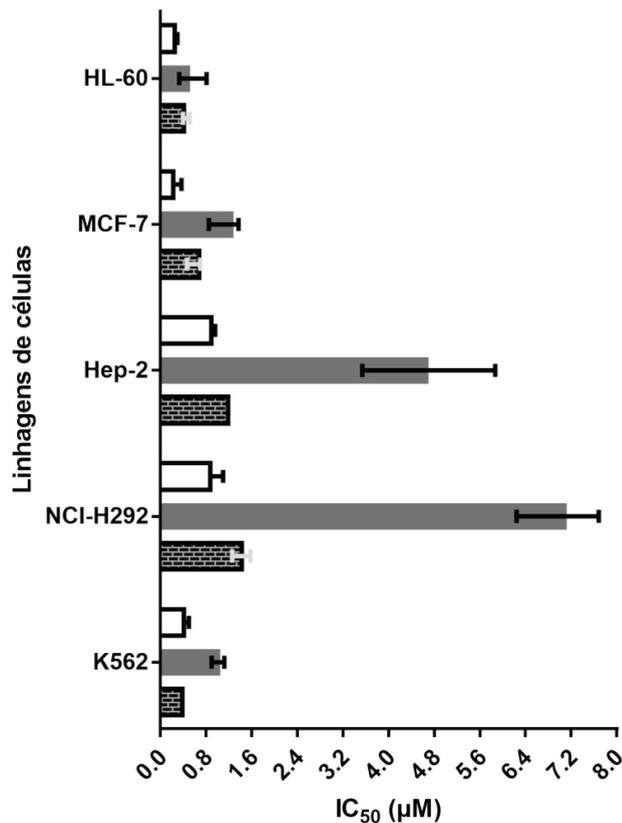
2.4 COLORAÇÃO DIFERENCIAL POR LARANJA DE ACRIDINA/BROMETO DE ETÍDIO

Este método permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose por meio da contagem diferencial por fluorescência. As suspensões de células controle e tratadas com os compostos foram transferidas para eppendorfs e centrifugadas por 3min em baixa rotação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 μL de solução de PBS. Em seguida, 1 μL da solução de Laranja de Acridina/Brometo de Etídio foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células foi transferida para uma lâmina e montado com lamínula para, em seguida, ser contada considerando cada evento celular de interesse, foram contadas 300 (trezentas) células, em duplicata, para quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos no uso do Pioglitazona isoladamente para cada linhagem de células tumorais podem ser observados na Figura 1, a combinação de pioglitazona e doxorubicina apresentou efeitos citotóxicos significativos em todas as linhagens testadas. Nas linhagens de K562, Hep-2 e NCI-H292 os efeitos da combinação de doxorubicina+pioglitazona não apresentou diferenças estatísticas em comparação aos resultados obtidos pelo uso da doxorubicina usada isoladamente.

Figura 1 – Atividade citotóxica dos fármacos isoladamente e em combinação. Os resultados estão expressos em IC₅₀ e intervalos de confiança de três experimentos diferentes obtidos por regressão não-linear



▨ Doxorrubicin

■ Pioglitazona

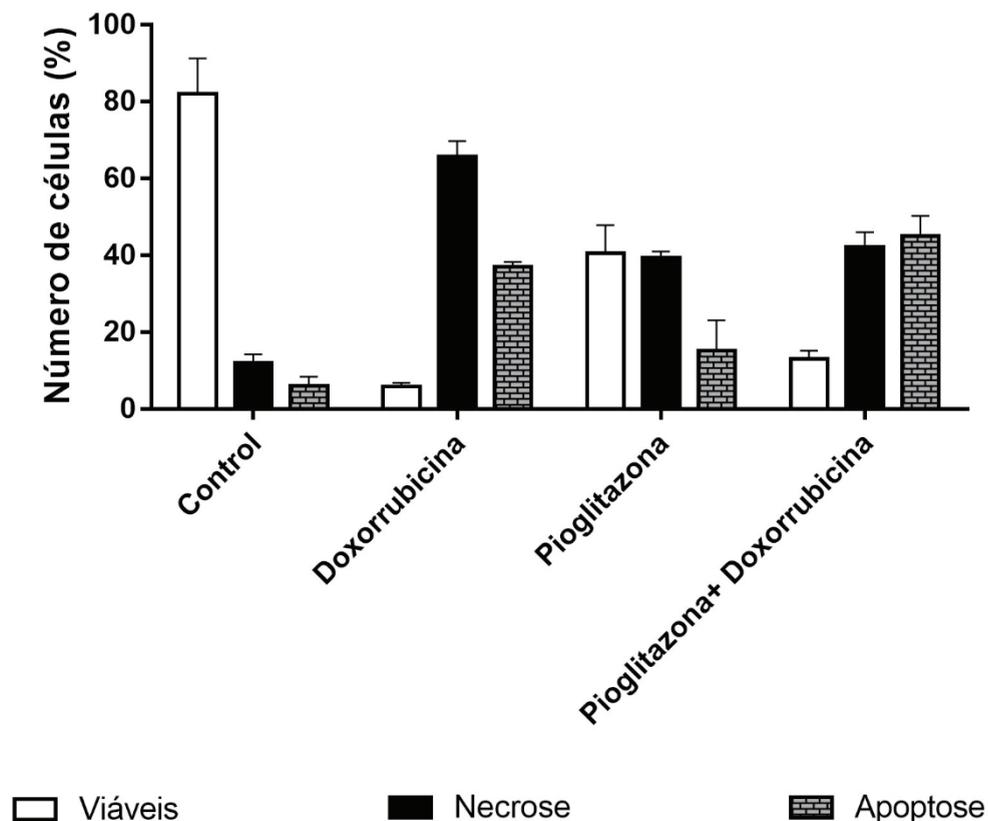
□ Pioglitazona+ Doxorrubicina

Fonte: Os Autores

A análise do tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com os fármacos isoladamente e combinados, na linhagem de K562, pode ser observado na Figura 2. A combinação de pioglitazona e doxorrubicina induziu apoptose na maioria das células, indicando um efeito mais seletivo e menos tóxico.

Várias pesquisas demonstraram o efeito dos agonistas do PPAR γ , inibindo a proliferação celular e atuando nos pontos de controle do ciclo celular (KOEFFLER, 2003, HEANEY, 2004). A ativação do PPAR γ também está relacionada a apoptose, principalmente pelo aumento da expressão dos genes p27 e c-myc (OHTA et al., 2001; MARTELLI et al., 2002).

Figura 2 – Análise do tipo de morte celular em K562. Os resultados estão expressos em número de células, obtidas pela coloração diferencial por Laranja de Acridina/Brometo de Etídio



Fonte: Os Autores

A troglitazona, um potente agonista do PPAR γ , promoveu inibição significativa do crescimento celular em linhagens de células neoplásicas tireoidianas por parada do ciclo celular e apoptose (PARK et al., 2005). Esse fármaco inibiu também a proliferação em células derivadas de câncer de fígado humano (HepG2), pela via de ativação da caspase 3, redução da expressão do gene BCL2 e aumento da expressão dos genes BAX e BAK (LI et al., 2003).

O tratamento com pioglitazona mostrou-se eficaz em linhagens leucêmicas e em células de câncer de colón, onde houve notável diminuição da proliferação e indução de apoptose (ZANG et al., 2006; CERBONE et al., 2007). Os experimentos realizados por Zhang e outros autores (2007), demonstraram que fármacos agonistas do PPAR podem ser usados em associação com quimioterápicos, utilizados comumente no tratamento do câncer, potencializando seu efeito.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que os efeitos da utilização da Pioglitazona associada a baixas doses de Doxorrubicina, apresentam uma correlação sinérgica extremamente efetiva quanto à citotoxicidade e inibição do desenvolvimento celular em linhagens tumorais. Nossos resultados sugerem que o uso associado da doxorrubicina com a pioglitazona poderia reduzir os efeitos adversos pelo uso de doses terapêuticas mais baixas.

REFERÊNCIAS

- BARROS, André. **Avaliação da inibição do crescimento tumoral pelo tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona isoladamente e em associação. Programa de pós-graduação em inovação terapêutica**, Centro de ciências biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2010.
- CERBONE, A. *et al.* 4-Hydroxynonenal and PPAR γ ligands affect proliferation, differentiation, apoptosis in colon cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v.42, p.1661-1670, 2007.
- GOLDHIRSCH, A. *et al.* Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. 2007. **Ann. Oncol.**, v.18, n.7, p.1133-44, jul. 2007.
- HEANEY, A.P. Novel pituitary ligands: peroxisome proliferator-activated receptor- γ . **Pituitary**, v.6, p.153-159, 2004.
- KOEFLER, H.P. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and cancers. **Clinical cancer research**, v.9, p. -9, 2003.
- LAL, S. *et al.* CBR1 and CBR3 pharmacogenetics and their influence on doxorubicin disposition in Asian Breast cancer patients. **Cancer Sci.**, v.99, n.10, p.2045-54, out. 2008.
- LI, Y. *et al.* PPAR γ pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells. **World Journal of Gastroenterology**, v.9, n.6, p.1220-1226, 2003.
- LIU, j.K.; LAUFS, U. pleiotropic effects of statins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.45. p.89-118, 2005.
- MARTELLI, M.L. *et al.* Inhibitory effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on thyroid carcinoma cell growth. **J. Clin Endocrinol Metab.**, v.87, p.4728-4735, 2002.

MARTINS, Leticia. *et al.* Anafilaxia à doxorubicina após três aplicações. **Arta Scientiae Veterinariae**, v.40 (supl 1), p.s1-s60, 2012.

OHTA, K. *et al.* Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.86, n.5, 2170-2177, 2001.

PADDOCK, M.L. *et al.* MitoNEET is a uniquely folded 2Fe 2S outer mitochondrial membrane protein stabilized by pioglitazone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.36, p.14342-14347, 2007.

PARK, J.W. *et al.* Troglitazone, the peroxisome proliferator- activated receptor-gamma agonist, induces antiproliferation and redifferentiation in human thyroid cancer cell lines. **Thyroid**, v.15, n.3, p.222-231, 2005.

SASSANO, A; PLATANIAS, L.C. Statins in tumor suppression. **Cancer Letters**, v.260, p.11-19, 2008.

WONG, A.L. *et al.* Body fat composition impacts the hematologic toxicities and pharmacokinetics of doxorubicin in Asian breast cancer patients. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.144, n.1, p.143-52, fev. 2014.

ZHANG, W; ZHANG, H; XING, L. Influence of ciglitazone on A549 cells growth in vitro and in vivo and mechanism. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, v.26, p.36-39, 2006.

ZHANG, Y.Q. *et al.* Rosiglitazone enhances fluorouracil-induced apoptosis of HT-29 cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, p.1534-1540, 2007.

Data do recebimento: 14 de Junho de 2017

Data da avaliação: 10 de Julho 2017

Data de aceite: 24 de Agosto de 2017

1 Graduanda do Curso de Odontologia, Faculdade Integrada de Pernambuco – FACIPE.

E-mail: sandrimaria23@gmail.com

2 Graduando do Curso de Odontologia, Faculdade Integrada de Pernambuco – FACIPE.

E-mail: vitinhoqueiroz@hotmail.com

3 Graduanda do Curso de Odontologia, Faculdade Integrada de Pernambuco – FACIPE.

E-mail: thamaraonoffre@hotmail.com

4 Graduanda do Curso de Odontologia, Faculdade Integrada de Pernambuco – FACIPE.

E-mail: thaysamello@hotmail.com

5 Biólogo, Doutor em Ciências Biológicas, Professor dos Cursos de Biomedicina, Estética e Cosmética, Odontologia e Radiologia, Faculdade Integrada de Pernambuco – FACIPE. E-mail: alsb5@yahoo.com.br

