AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA HIPERGLICEMIA ASSOCIADA A DOSES CRESCENTES DE INSULINA EM ADENOCARCINOMA DE MAMA

Isadora Machinski (PIBIC/CNPq/FA/UEPG), Evelyn Assis de Andrade (Mestranda PPGCF UEPG/UNICENTRO), Giovani Marino Favero (Orientador);
isa.machinski@gmail.com, gmfavero@yahoo.com.br
Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Biologia Geral

Morfologia; Citologia e Biologia Celular

Palavras-chave: Adenocarcinoma Mamário, Hiperglicemia, Insulina

Resumo

O câncer de mama é o primeiro em mortalidade de mulheres em todo o mundo, e observa-se que a sua incidência aumenta após os 50 anos. Inúmeras doenças também têm sua prevalência nessa faixa de idade, como diabetes. A glicose é um estimulador de crescimento de células cancerígenas, ou seja, da progressão tumoral. Objetivou-se avaliar diferentes concentrações de glicose e insulina em células de adenocarcinoma de mama (MCF7). Foram realizadas técnicas de cultivo celular com avaliação de citotoxicidade pelo método do MTT e Vermelho Neutro para diferentes concentrações de glicose e insulina. Observou-se que a concentração ótima para o crescimento celular das linhagens MCF7 e 3T3 em meio hipertônico é de 10,5mM e que a insulina em concentrações de 7 a 10 UI apresenta maior toxicidade celular e que quanto mais reduzida é a sua concentração melhores são os resultados de viabilidade celular. Pode-se concluir que a insulina apresenta maior toxicidade para as células da linhagem tumoral.

Introdução

No Brasil, o câncer de mama é a neoplasia mais incidente na população feminina, depois do câncer de pele não melanoma, respondendo por aproximadamente 28% dos casos novos a cada ano. É também o primeiro em mortalidade por câncer em mulheres, com taxa bruta de 11,49 a cada 100 mil (INCA, 2007). Diversos fatores estão ligados ao aumento do risco de desenvolver a doença, como: idade, fatores endócrinos, fatores comportamentais e ambientais e fatores genéticos e hereditários.

O fator idade relaciona fatores endócrinos, metabólicos, comportamentais e ambientais. Desta forma, o câncer de mama é considerado relativamente raro antes dos 35 anos e sua incidência cresce progressivamente após os 50 anos de idade. O sexo feminino apresenta esta particularidade com o envelhecimento, caracterizado pela menopausa. Durante a menopausa há alterações no sistema reprodutivo e endócrino que geram mudanças importantes na composição corporal. Uma dessas mudanças é um aumento na distribuição central da massa corporal em mulheres na pós-menopausa. Esta distribuição, chamada obesidade abdominal, é um sinal de resistência à insulina, a qual pode estar relacionada ao risco de desenvolver câncer de mama (ACTIS, 2009; DAVOODI, 2013).

A resistência à insulina causada por sobrepeso é uma das causas de diabetes mellitus tipo II, pois com essa resistência aumentam os níveis de glicemia no sangue. Assim, sabe-se que a hiperglicemia é um fator de crescimento tumoral, porém não existem evidências de qual seria o comportamento dessas células frente à utilização de diferentes doses de insulina e diferentes taxas de hiperglicemia.

ISSN 1676-0093

Dessa forma, objetivou-se avaliar diferentes concentrações de glicose e insulina em células de adenocarcinoma de mama (MCF7).

Material e Métodos

Foram utilizadas células de adenocarcinoma de mama (MCF7) e células de fibroblastos (3T3), as quais foram mantidas por expansão contínua em meio RPMI® 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), penicilina e amicacina, em estufa a 37 °C com atmosfera umidificada a 5% de CO_2.

A avaliação de citotoxidade foi realizada pelo método de redução de MTT e ensaio de Vermelho Neutro. As células foram incubadas em placas de 96 poços e mantidas em meio RPMI. Após esse período, adicionou-se o tratamento escolhido (meio hipertônico, sendo 500 ml de meio RPMI adicionado de 1,77g de manitol e 1,75g de dextrose, para obter a concentração de 45,5mM de glicose ou insulina) e incubados por 48 horas. Para a leitura, no ensaio de redução de MTT, os cristais de formazan resultantes foram solubilizados em solução de álcool isopropílico, então leu-se a densidade ótica a 560 nm, em espectrofotômetro UV/Vis. Para o ensaio de Vermelho Neutro a absorbância foi medida a 520 nm, em espectrofotômetro UV/Vis.

Os resultados obtidos foram avaliados pelo software GraphPad Prism®, versão 6.01 para Windows, por análise de variância (ANOVA de uma via), seguido de pós-teste de Tukey. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média, com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$), os quais foram utilizados para cálculo de Concentração inibitória de 50%(CI_{50}) e índice de seletividade (IS).

Resultados e Discussão

Primeiramente, realizou-se uma comparação das linhagens celulares frente às diferentes exposições. Ao comparar meio RPMI e meio RPMI com insulina observa-se uma queda na viabilidade celular em aproximadamente 30% para 3T3 e 50% para MCF7; comparando meio RPMI e meio hipertônico observou-se uma queda de aproximadamente 60% para 3T3 e em mais de 90% para MCF7 e comparando meio hipertônico e meio hipertônico mais insulina observa-se queda de aproximadamente 90% para 3T3 e de 85% para MCF7 (Figura 1).

Analisando a influência do meio hipertônico (concentração de 45,5mM de glicose), realizou-se testes de viabilidade celular (Figuras 2) para diferentes concentrações do meio com o objetivo de encontrar a melhor faixa de concentração para o crescimento celular de ambas as células (3T3 e MCF7).

Testou-se as seguintes concentrações do meio: 45,5mM, 40,5mM, 35,5mM, 30,5mM, 25,5mM, 20,5mM, 15,5mM, 10,5mM, 5,5mM e 0,5mM. Sendo assim, observou-se que a concentração que proporciona o melhor crescimento celular é a de 10,5mM, a qual mantém a faixa de viabilidade acima de 80% para as duas linhagens celulares.

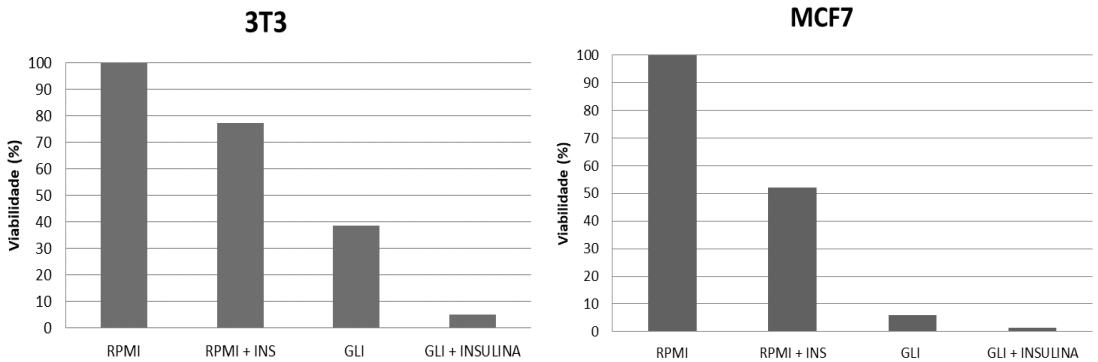


Figura 1. Avaliação da viabilidade celular de células 3T3 e MCF7 em diferentes condições de cultivo.

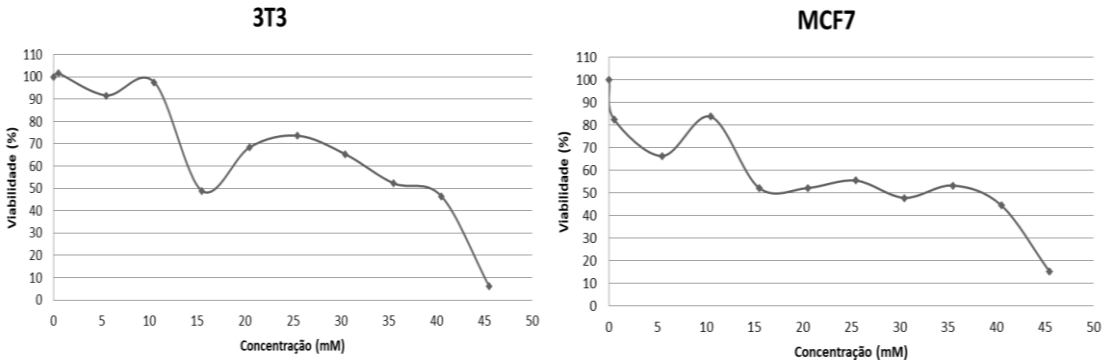


Figura 2. Avaliação da viabilidade celular de diferentes concentrações do meio hipertônico frente às linhagens 3T3 e MCF7.

Definindo-se a melhor concentração do meio hipertônico realizou-se a avaliação de citotoxicidade das linhagens em meio hipertônico frente ao tratamento com diferentes concentrações de insulina regular (Figura 3).

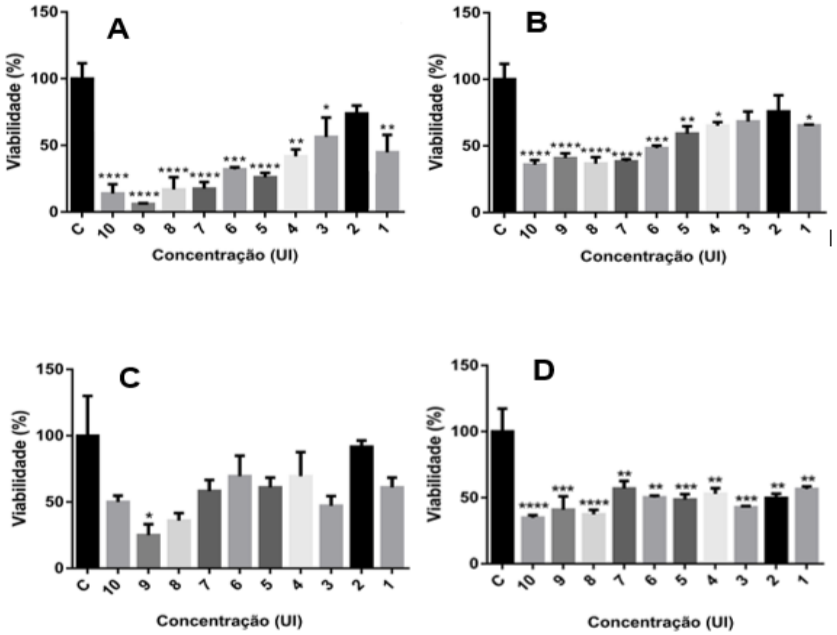


Figura 3. Viabilidade celular após 2 horas de exposição a diferentes concentrações de insulina pelo método do MTT (B=MCF7 e D=3T3) e Vermelho neutro (A=MCF7 e C=3T3). Cada coluna representa a média ± desvio padrão da média, considerando 2 experimentos diferentes em triplicata e considerando como significativo p<0,0001 = ****, p<0,001 = ***, p<0,01 = **, p<0,05 = * em relação ao controle (células incubadas apenas com o meio RPMI hipertônico).

Para o método de MTT, a linhagem de MCF7, apresentou viabilidade reduzida, com diferença estatística com relação ao controle nas concentrações de 7, 8, 9 e 10 UI. Para o método MTT, mas para a linhagem de 3T3 observou-se que as concentrações não apresentam diferença entre elas, porém há diferença entre elas e o controle, apresentando assim uma redução na viabilidade celular frente a insulina. Já no teste Vermelho neutro, observou-se ampla variedade de viabilidade entre as diferentes concentrações testadas, apresentando diferença significativa somente para a concentração de 9 UI.

Em análises morfológicas, observou-se que após os períodos de incubação e antes da realização dos métodos esperava-se maiores diferenças entre as

ISSN 1676-0093

concentrações analisadas. Frente a isso, sabendo que as linhagens MCF7 e 3T3 são células de adesão, acredita-se que a insulina pode interferir na adesão das células.

Através dos cálculos de $CI_{50,}$ pode-se observar que a linhagem tumoral (MCF7) é vulnerável ao potencial da insulina quando comparada à linhagem não tumoral (3T3), uma vez que a CI_{50} para MCF7 apresentou valores de 5,456 UI e 4,760 UI, respectivamente para MTT e Vermelho neutro, e para 3T3 apresentou valores de 7 UI. Confirma-se, através do Índice de seletividade, que a insulina se apresentou mais tóxica para a linhagem tumoral já que que se observa valores de IS superiores a 1, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de IC_{50} obtidos para as linhagens celulares tratadas com insulina e os Índices de Seletividade de linhagem tumoral (MCF7) em relação a linhagem não tumoral (3T3).

	Linhagem	CI_{50} (UI de insulina)	IS
MTT	3T3	7,420	1,36
	MCF7	5,456	
VN	3T3	7,074	1,49
	MCF7	4,760	

Conclusões

Concluiu-se, então, que a concentração ótima para o crescimento celular das linhagens MCF7 e 3T3 em meio hipertônico é de 10,5mM. Pode-se analisar, também, que a insulina em maiores concentrações apresenta toxicidade celular e que quanto mais reduzida é a sua concentração melhores são os resultados de viabilidade celular, apresentando, dessa forma, uma proposta para estudos futuros com concentrações de insulina inferiores a 1 UI. Pode-se concluir, através do CI_{50} e do IS que a insulina apresenta maior toxicidade para as células da linhagem tumoral.

Agradecimentos

À UEPG, ao PIBIC, às agências/instituições de financiamento e fomento (CNPq, Fundação Araucária, UEPG).

Referências

ACTIS, A. et al; Factores de riesgo convencionales y emergentes en cáncer de mama: un estudio en pacientes posmenopáusicas; Revista Chilena de Obstetricia e ginecologia, 74, 3, 135 – 142, Janeiro, 2009.

MACHADO, V. et al; Morbidity and associated factors in climacteric women: a population based study in women with 11 or more years of formal education; Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia, 34, 5, Rio de Janeiro, Maio, 2012.

PALACIOS, S. et al,The importance of preventive health care in post-menopausal women, Maturitas, 52, 1, 53-60, 2005.

FALAGAS, M. et al. Under-diagnosis of common chronic diseases: prevalence and impact on human health. International Journal of Clinical Practice, 61, 9, 1569-79, 2007.

AGRESTI, R. et al. Association of adipositu, dysmetabolisms, and inflammation with aggressive breast câncer subtypes: a cross-sectional study. Breast Cancer Research and Treatment, 157, 1, 179-89, 2016.

ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAÚDE; Research on the Menopause in the 1990´s: proceedings of a meeting. Geneva, Switzerland, 14-17 Junho 1994. Maturitas. 1996;23(2):109-259.