

# Efeito da doxorrubicina e ciclofosfamida isoladas e combinadas na linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7

Carolina Bueno Luzardo<sup>1</sup>, Jessica Machado Miri<sup>2</sup>, Lucas Umpierre Conter<sup>2</sup>, Ana Paula de Souza<sup>4</sup>, Rafael Rodrigues Dihl<sup>5</sup>, Ivana Grivicich<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Medicina, ULBRA, Bolsista PIBIC/CNPq, <sup>2</sup>Acadêmica de doutorado do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA, Bolsista CAPES/PROSUP, <sup>3</sup>Biomédico, Doutor em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA, <sup>4</sup>Biomédica, Doutora em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde ULBRA, <sup>5</sup>Professor dos Cursos de Biomedicina, Ciências Biológicas e Farmácia, do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, ULBRA, <sup>6</sup>Professora-Orientadora dos Cursos de Biomedicina, Farmácia e Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA, grivicich@ulbra.br

## Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da interação entre doxorrubicina e ciclofosfamida na linhagem celular de carcinoma de mama MCF-7. Para isto, utilizamos o ensaio de Sulforodamina B (SRB) para a citotoxicidade, citometria de fluxo para distribuição de células no ciclo celular e teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN) para mutagenicidade. Os resultados mostraram que a linhagem MCF-7 é mais sensível à doxorrubicina e quando combinada com ciclofosfamida apresenta uma potencialização do efeito. Todos os tratamentos induziram parada em G2/M e aumento de células em SubG1. Além disso, somente o tratamento combinado foi capaz de reduzir os valores de índice de proliferação com bloqueio da citocinese (CBPI) em relação ao grupo controle negativo, indicando citotoxicidade e morte celular. Assim, este estudo mostrou que o cotratamento com doxorrubicina e ciclofosfamida é mais efetivo que os agentes isolados e que este efeito está associado com bloqueio das células na fase G2/M do ciclo celular e indução de morte celular.

**Palavras-chave:** câncer de mama, doxorrubicina, ciclofosfamida, apoptose

## Abstract

The aim of the study was to evaluate the effect of the interaction between doxorubicin and cyclophosphamide on the MCF-7 breast carcinoma cell line. For this, we used the Sulforhodamine B (SRB) assay for cytotoxicity, flow cytometry for cell cycle distribution and cytokinesis block micronucleus test (CBMN) for mutagenicity. The results showed that the MCF-7 strain is more sensitive to doxorubicin and when combined with cyclophosphamide, it has a potentiation of the effect. All treatments induced arrest in G2/M and cell growth in SubG1. Furthermore, only the combined treatment was able to reduce the cytokinesis blocking proliferation index (CBPI) values in relation to the negative control group, indicating cytotoxicity and cell death. Thus, this study showed that doxorubicin and cyclophosphamide co-treatment is more effective than the agents alone and that this effect is associated with G2/M phase arrest and induction of cell death.

**Keywords:** breast cancer, doxorubicin, cyclophosphamide, apoptosis

## Introdução

O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer que afeta as mulheres. Em 2020, foram diagnosticadas 2,3 milhões de mulheres com câncer de mama, com 685.000 mortes em todo o mundo. O câncer de mama ocorre em todos os países do mundo em mulheres de qualquer idade após a

puberdade, mas com taxas crescentes na vida posterior (LEI *et al.*, 2021). No Brasil, quando excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o tipo de câncer mais comum em mulheres de todas as regiões, apresentando taxas mais elevadas nas regiões Sul e Sudeste. Estima-se que para o ano de 2023 haverá 73.610 novos casos,

o que equivale a uma taxa de incidência de 41,89 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2022).

A idade é um dos principais fatores de risco para o câncer de mama, mas também podem contribuir: histórico familiar, alcoolismo, sedentarismo, fatores endócrinos, história reprodutiva, entre outros (COLEMAN et al., 2008). 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. Seis tipos de tratamentos padrões são usados para o câncer de mama, que são: cirurgia, biópsia do linfonodo sentinela, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia alvo (THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2023).

Considerando ser uma doença complexa, o câncer de mama pode ser tratado de diversas maneiras, sendo as principais: mastectomia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, ou o tratamento conjunto dessas terapias. Entre os principais antineoplásicos utilizados para o câncer de mama estão a ciclofosfamida, o metotrexato, o taxol, o 5-fluorouracil e a doxorrubicina. O tratamento conjunto de doxorrubicina e ciclofosfamida é um dos protocolos mais utilizados no mundo em tumores em estágio inicial de câncer de mama (FISUSI; AKALA, 2019).

A doxorrubicina é um quimioterápico classificado com antibiótico antineoplásico, pertencente ao grupo das antraciclina e foi isolado pela primeira vez em 1967 de colônias fúngicas mutantes de *Streptomyces peucetis* var. *caesius* (MA; MUMPER, 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 ácido desoxirribonucleico (DNA), mas também pela geração de espécies reativas de oxigênio. A doxorrubicina 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 (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2010). Utilizada como um agente imunossupressor e antineoplásico, a ciclofosfamida é um agente alquilante, pertencente à classe das oxazafosfarinas, empregada no tratamento de leucemias agudas, mielomas múltiplos, artrite reumatoide e diversos tipos de neoplasias. Possui

limitação quando usada como quimioterápico, pois pode prejudicar o tecido normal e possui efeito cardiotoxico. Um fator importante para avaliação dos efeitos terapêuticos e tóxicos da ciclofosfamida é a necessidade de ativação metabólica pelo citocromo P450. Mostarda fosforamida e acroleína são os dois metabólitos ativos da ciclofosfamida. Os efeitos antineoplásicos e tóxicos da ciclofosfamida estão ligados à mostarda fosforamida e à acroleína, respectivamente (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 (IQUBAL et al., 2019).

A linhagem celular MCF-7 é a mais utilizada em pesquisas referentes ao câncer de mama. Uma de suas principais colaborações é a sua importância para os estudos do receptor de estrogênio alfa. Relatos de que a regulação do fator de crescimento do estrogênio poderia ser a explicação de como este regula o ciclo celular, como também induz e reprime alguns genes indicando uma alteração no crescimento. Muito utilizada também para estudos genômicos por sua característica de reproduzir quantidade ilimitada de DNA e RNA (LEE; OESTERREICH; DAVIDSON, 2015). A MCF-7 é uma linhagem celular derivada de adenocarcinoma de glândula mamária humana que foi obtida de paciente caucasiano com 69 anos. Além disso, apresenta uma média de 82 cromossomos (variando de 66 a 87) e super expressa receptor de estrogênio (ATCC, 2023).

O mecanismo de ação da doxorrubicina e da ciclofosfamida são conhecidos, porém, os mecanismos envolvidos na combinação de ambos não foram amplamente estudados. Nesse sentido, estudos *in vitro* poderão auxiliar a elucidar os mecanismos de interação desses fármacos no câncer de mama. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da interação entre doxorrubicina e ciclofosfamida na linhagem celular de carcinoma de mama MCF-7.

## Materiais e Métodos

### *Linhagem celular e manutenção das culturas*

Foi utilizada a linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 adquirida da *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, EUA). As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com meio de cultura RPMI-1640 contendo L-glutamina 2% (p/v) e soro fetal bovino 10% (v/v), a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de no mínimo 95%. As culturas celulares foram mantidas em crescimento exponencial através do sub-cultivo das células em meio de cultura.

### *Avaliação da citotoxicidade*

A linhagem celular MCF-7 foi inoculada em placas de 96 poços e, estabilizada por 24h e então, tratada por 48h com concentrações obtidas com base na literatura (HANDAYANI et al., 2022; HERTZ et al., 2015). As concentrações utilizadas para a doxorubicina foram 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30  $\mu\text{M}$  e para ciclofosfamida 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320  $\mu\text{M}$ . O cotratamento foi realizado utilizando a  $\text{IC}_{50}$  da ciclofosfamida e as concentrações descritas anteriormente para doxorubicina. Após esse período, as células foram fixadas em ácido tricloroacético (TCA; 50%) e coradas com sulfurodamina B (SRB; 0,4%). O excesso de SRB foi removido com ácido acético (1%). O SRB ligado às proteínas foi solubilizado com base trizma (10 mM, pH 10,5). O SRB ligado é proporcional a densidade celular e foi determinado através das absorvâncias medidas em comprimento de onda de 540 nm usando um leitor de microplacas. Os resultados foram corrigidos pelas absorvâncias do *background*. O perfil de dose-resposta foi utilizado para derivar os valores de  $\text{IC}_{50}$ , isto é, a concentração de droga necessária para inibir 50% do crescimento celular, quando comparada aos controles sem droga. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  de cada quimioterápico foram utilizados para os testes com as combinações das drogas (SKEHAN et al., 2015).

### *Análise do Ciclo Celular e Morte Celular*

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. Para isto,  $5 \times 10^5$  células foram lavadas, removidas dos frascos com tripsina/EDTA e ressuspendidas em meio de cultura. A seguir foram centrifugadas, lavadas em PBS gelado e fixadas em etanol 70%. A seguir as amostras foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS e tratadas com solução contendo citrato de sódio (3,4 mM), iodeto de propídio (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e RNase A (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 30min, na ausência de luz (RICCARDI; NICOLETTI, 2006). A distribuição das células nas fases do ciclo celular e percentual de morte foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences). Os resultados foram expressos em percentual de células por fase do ciclo celular, e as células em fase subG1 foram consideradas células em apoptose/necrose.

### *Teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN)*

Para a realização dos experimentos, foi inoculada uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço em uma placa de 24 poços, incubadas por 24h e submetidas ao tratamento por 24h com as concentrações de  $\text{IC}_{50}$  da doxorubicina e ciclofosfamida (0,23  $\mu\text{M}$  e 179  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Para a combinação

foram utilizados os valores de  $\text{IC}_{50}$  dos dois agentes de forma simultânea. O controle negativo foi o meio de cultura completo. O ensaio CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007) com pequenas modificações. As células foram lavadas duas vezes com solução salina HBSS e adicionada a citocalasina B (Cyt-B) (Sigma-Aldrich) na concentração final de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em meio de cultura completo. Após 24 horas, a Cyt-B foi removida e as células foram lavadas com HBSS a 37°C, tripsinizadas, neutralizadas e coletadas em citocentrífuga (Cientec) (5 min a 700 rpm) para serem fixadas nas lâminas, coradas (*Instant-Prov/Newprov*®) e desta forma prontas para a realização das análises em microscópio óptico com um aumento de 1000 x. O critério de seleção, assim como o de contagem de células binucleadas com micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN) e broto nuclear (BrN) foi definido de acordo com Fenech (2007).

O parâmetro utilizado para a avaliação da cinética celular foi o índice de proliferação com bloqueio da citocinese (CBPI). Neste sentido, 500 células foram analisadas por cultura e verificadas quanto à frequência de células mono, bi, tri e multinucleadas. A partir destes dados o CBPI foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{CBPI} = [M1 + 2(M2) + 3(M3 + M4) / \text{NT}]$$

Sendo assim, M1 - M4 representam o número de células com 1 - 4 núcleos e NT corresponde ao número total de células analisadas. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula: % de inibição da proliferação celular =  $100 - 100 \{ (\text{CBPIT} - 1) \div (\text{CBPIC} - 1) \}$ . Onde, CBPIT se refere ao índice de proliferação com bloqueio da citocinese do grupo tratado e CBPIC se refere ao índice de proliferação com bloqueio da citocinese do grupo controle.

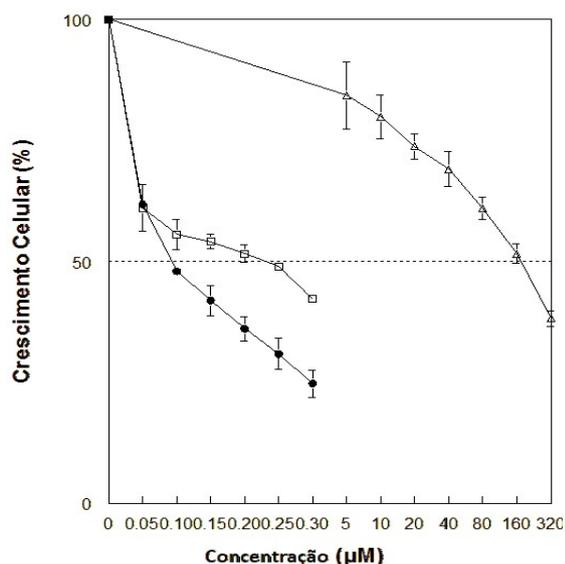
### *Análise Estatística*

As análises estatísticas foram realizadas com a análise de variância (*one-way ANOVA*) com o teste post hoc de Dunnett's. Os valores de  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  foram considerados estatisticamente significativos. Os testes foram realizados no software *Graphpad Prism*® (*Graphpad Software Inc*; versão 5.01).

## **Resultados e Discussão**

### *Efeito citotóxico da doxorubicina e ciclofosfamida isoladas e em combinação*

Após 48h de exposição, os efeitos citotóxicos (Figura 1) da doxorubicina e da ciclofosfamida na linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 foram avaliados e definidos os valores de  $\text{IC}_{50}$  (Tabela 1).



**Figura 1.** Inibição do crescimento celular na linhagem celular de carcinoma de mama MCF-7 pela doxorubicina (□), ciclofosfamida (Δ) ou combinação ciclofosfamida e doxorubicina (●) por 48 h. Os resultados são média ± DP (barras verticais; n = 6).

A doxorubicina apresentou maior potencial citotóxico, com o IC<sub>50</sub> de 0,23 ± 0,02 µM, quando comparada com a ciclofosfamida. Resultado semelhante foi obtido por Osman *et al.* (2012), que realizou um estudo sobre a modulação do efeito da doxorubicina pelo resveratrol em linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 mostrando um efeito citotóxico da doxorubicina isolada com IC<sub>50</sub> de 0,41 ± 0,10 µM.

**Tabela 1** - Valores de IC<sub>50</sub> (µM; média ± DP, n = 6) de ciclofosfamida e doxorubicina isoladas ou combinadas na linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 após tratamento por 48 h.

	IC <sub>50</sub> (µM)
Ciclofosfamida	179,0 ± 23,4
Doxorubicina	0,23 ± 0,02
Ciclofosfamida + Doxorubicina	0,09 ± 0,01*

\*Diferente dos tratamentos com os agentes isolados (p<0,05)

A ciclofosfamida é comumente utilizada para o tratamento de vários tipos de câncer, sendo mais potente após a conversão para sua forma ativada pelo fígado. Um recente estudo comparou a toxicidade da cantaridina em relação aos principais quimioterápicos utilizados em câncer de mama, demonstrou que as linhagens celulares de adenocarcinoma de mama MCF-7 e MDAMB-231 apresentaram-se mais resistentes em relação à ciclofosfamida (KERN; SCHROEDER, 2014) Assim como no nosso estudo, onde a ciclofosfamida mostrou menor potencial citotóxico, com um IC<sub>50</sub> de 179,0 ± 23,4 µM (Tabela 1; Figura 1). Em outro estudo, foi encontrado um valor de IC<sub>50</sub> de 6600 µM

para a linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231. Estas diferenças de valores estão associadas à variabilidade de características moleculares das linhagens celulares e ensaio utilizados (KIRSON *et al.*, 2009).

A combinação da ciclofosfamida com a doxorubicina reduziu o IC<sub>50</sub> da doxorubicina em aproximadamente 2,5 vezes, sugerindo que a ciclofosfamida potencializa o efeito da doxorubicina (Tabela 1; Figura 1). Este é o primeiro estudo, *in vitro*, utilizando essa combinação e sugerindo uma interação entre elas.

#### Efeito dos Tratamentos no Ciclo Celular e Morte Celular

Para identificar o mecanismo de ação envolvido na interação entre os dois antineoplásicos avaliamos a distribuição das células nas fases do ciclo celular utilizando IC<sub>50</sub> da ciclofosfamida e doxorubicina, isolados ou na forma de cotratamento. Os resultados (Tabela 2) demonstraram que no controle não tratado o maior percentual de células (73,3 ± 2,9 %) se encontrava na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e um pequeno percentual encontrava-se na fase Sub G<sub>1</sub> (1,8 ± 0,4), que representa fração de células onde ocorreu fragmentação de DNA, indicativo de células em apoptose/necrose (MANOHAR; SHAH; NAIR, 2021). Nesse sentido, PATEL *et al.* (2015), ao analisar o efeito da curcumina no ciclo celular, utilizando a linhagem MCF7, determinou que sem tratamento a linhagem encontra-se em maior percentual na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do ciclo celular.

**Tabela 2:** Efeito do tratamento com ciclofosfamida e doxorubicina isolados ou combinados sobre a distribuição das células nas fases do ciclo celular da 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).

	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	S (%)	G <sub>2</sub> /M (%)	SubG <sub>1</sub> (%)
Controle	73,3 ± 2,9	7,4 ± 2,1	13,8 ± 1,1	1,8 ± 0,4
Ciclofosfamida	37,3 ± 1,5*	10,2 ± 0,9	43,2 ± 3,1*	5,5 ± 0,3*
Doxorubicina	41,4 ± 1,3*	5,5 ± 0,5	43,5 ± 3,7*	4,8 ± 0,6*
Ciclofosfamida+ Doxorubicina	38,1 ± 1,9*	7,1 ± 2,1	45,1 ± 2,5*	6,6 ± 0,7*.*,†

\*Diferente do controle (p<0,05); \*Diferente do tratamento isolado com ciclofosfamida (p < 0,05); †Diferente do tratamento isolado com doxorubicina (p < 0,05).

Por outro lado, as células tratadas com doxorubicina, ciclofosfamida ou a combinação de ambos apresentaram um maior percentual de células nas fases G<sub>2</sub>/M, não demonstrando diferença significativa se comparadas entre si (Tabela 2). Nesse sentido, foi demonstrado nas linhagens MCF-7 e NIH3T3, que as

células não tratadas apresentavam aproximadamente 70% de células em fase G0/G1 e após tratamento com doxorrubicina foi verificado 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). Outro estudo demonstrou que a doxorrubicina, na linhagem de câncer de mama MCF-7, inibe a proliferação celular através de parada do ciclo celular na fase G2/M, levando a morte celular (WEI; XIAOJUN; PEILONG, 2021). Um estudo avaliando a sensibilidade de células de câncer de mama humano MCF-7 em relação a ciclofosfamida, concluiu que este composto gerou um atraso na progressão da fase S e parada na fase G2/M do ciclo celular, possivelmente, em consequência de ligações cruzadas no DNA (KHAN *et al.*, 2019). Demonstramos também que todos os tratamentos também mostraram um aumento de células na fase SubG1, quando comparadas ao controle (Tabela 2). Além disso, a combinação apresentou um número maior de células em SUBG1 quando comparada com os tratamentos isolados (Tabela 2), sugerindo que o efeito observado esteja associado com aumento de morte celular. Nesse sentido, Pondugula *et al.* (2022) demonstraram, em modelo animal, que a combinação de doxorrubicina com ciclofosfamida aumentaram a atividade da Caspase-3, indicando um aumento de apoptose quando comparado com o grupo não tratado.

#### Efeito Mutagênico dos Tratamentos

Os resultados referentes à avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade associada aos tratamentos doxorrubicina e ciclofosfamida isolados ou combinados em linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 estão representados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Efeito do tratamento com Doxorrubicina (IC<sub>50</sub>) e Ciclofosfamida (IC<sub>50</sub>) isolados ou combinados sobre frequência de micronúcleos (MN/500 BN) e células apoptóticas (AP), células necróticas (NEC) e índice de proliferação com bloqueio da citocinese (CBPI) em 500 células da linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão, n=4.

	MN/500BN	AP	NEC	CBPI
Controle	5,2±2,2	15,0±3,9	9,5±1,9	1,63±0,02
Ciclofosfamida	11,0±6,9	39,8±5,1*	72,5±6,5*. <sup>#</sup>	1,77±0,10 <sup>#</sup>
Doxorrubicina	2,3 ±1,5	18,7±9,1	129,7±37,0*. <sup>#</sup>	1,29±0,12 <sup>#</sup>
Ciclofosfamida+ Doxorrubicina	1,0±0,01 <sup>#</sup>	17,3±9,7	25,3±10,2*	1,04±0,02 <sup>#</sup>

\*Diferente do controle (p<0,05); <sup>#</sup>Diferente do tratamento combinado (p < 0,05).

O índice de proliferação com bloqueio da citocinese (CBPI) e a porcentagem de inibição foram calculados tanto para a doxorrubicina quanto para a ciclofosfamida. O tratamento combinado foi capaz de reduzir, significativamente, os valores de CBPI em relação ao grupo controle negativo. A combinação dos dois agentes apresentou um baixo número de células binucleadas, podendo sugerir que este tratamento inibiu a divisão celular antes mesmo da ação da citocalasina B (Tabela 3).

A ciclofosfamida isolada mostrou um alto potencial de indução a apoptose (Tabela 3). Resultado que pode ser comparado com um estudo utilizando o ensaio de TUNEL em células de ovário de camundongos da linhagem C57BL/6, tratadas com ciclofosfamida, demonstrou que o tratamento leva a hiperativação do sinal de apoptose (CHEN *et al.*, 2016). Diferente do controle e do tratamento combinado, a doxorrubicina na concentração de IC<sub>50</sub> apresentou um alto índice de necrose (Tabela 3). A produção de radicais livres induzidos pela doxorrubicina pode ser uma das vias de indução de necrose deste quimioterápico. Isso pode ser explicado pelo aumento da concentração de cálcio mitocondrial resultando em uma diminuição de ATP. Os danos no DNA mitocondrial, somados a disfunção da mitocôndria, respiração e falta de ATP induzem as células a necrose (MEREDITH; DASS, 2016).

## Conclusões

Os resultados obtidos após a avaliação do efeito da doxorrubicina e ciclofosfamida em tratamentos isolados ou combinados na linhagem celular de câncer de mama humano MCF7 mostraram que a linhagem MCF7 apresentou maior sensibilidade a doxorrubicina, necessitando maior concentração? De Ciclofosfamida para atingir o mesmo potencial citotóxico. Quando os agentes são combinados sugerem um efeito sinérgico e este efeito pode estar associado com a capacidade de indução de morte por apoptose e/ou necrose.

## Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro recebido, Código de Financiamento 001.

## Referências

CHEN, Xiu-Ying; XIA, He-Xia; GUAN Hai-Yun; LI, Bin;

- ZHANG, Wei. Follicle Loss and Apoptosis in Cyclophosphamide-Treated Mice: What's the Matter? **International Journal of Molecular Science**, v. 17, p. 836-843, 2016.
- COLEMAN, Michael *et al.* Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). **Lancet Oncology**, v. 9, p. 730-756, 2008.
- FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p.1084–1104, 2007.
- FISUSI, Funmilola; AKALA, Emmanuel. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, p. 3-23, 2019.
- HANDAYANI, Sri *et al.* Synergistic Cytotoxic and Antimigratory Effect of Brazilein and Doxorubicin on HER2-Overexpressing Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.23, p.2623-2635, 2022.
- HERTZ, Everaldo *et al.* Effect of *Paullinia cupana* on MCF-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 3, p. 37-43, 2015.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>. Acesso em 19 mai. 2023.
- IQUBAL, Ashif *et al.* Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. **Life Science**, v. 218, p.112-131, 2019.
- KERN, Katie; SCHROEDER, Jennifer. Comparison of Cantharidin Toxicity in Breast Cancer Cells to Two Common Chemotherapeutics. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2014, p. 1-7, 2014.
- KHAN, Arif; ALDEBASI, Yousef; ALSUHAIBANI, Sultan; KHAN, Masood. Thymoquinone Augments Cyclophosphamide-Mediated Inhibition of Cell Proliferation in Breast Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 20, p. 1153-1160, 2019.
- KIRSON, Eilon *et al.* Chemotherapeutic treatment efficacy and sensitivity are increased by adjuvant alternating electric fields (TTFs). **BMC Medical Physics**, v. 9, p. 1-13, 2009.
- LEE, Adrian V.; OESTERREICH, Steffi; DAVIDSON, Nancy. MCF-7 cells-changing the course of breast cancer research and care for 45 years. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, p. djv073, 2015.
- LEI, Shaoyuan *et al.* Global patterns of breast cancer incidence and mortality: A population-based cancer registry data analysis from 2000 to 2020. **Cancer Communications (Lond)**, v. 41, p. 1183-1194, 2021.
- MA, Ping; MUMPER, Russel. Anthracycline Nano-Delivery Systems to Overcome Multiple Drug Resistance: A Comprehensive Review. **Nano Today**, v. 8, p. 313-331, 2013.
- MANOHAR, Sonal; SHAH, Praxi; NAIR, Anusree. Flow cytometry: principles, applications and recent advances. **Bioanalysis**, v. 13, p. 181-198, 2021.
- MEREDITH, Ann-Marie; DASS, Crispin. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p.729–741, 2016.
- OSMAN, Abdel-Moneim; BAYOUMI, Hadeel; AL-HARTHI, Sameer; DAMANHOURI, Zoheir. Modulation of doxorubicin cytotoxicity by resveratrol in a human breast cancer cell line. **Cancer Cell International**, v. 12, p. 2-8. 2012.
- PATEL, Pinaki; THAKKAR, Vasudev; PATEL, Jagdish. 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, Yves; LEO, Elisabetta; ZHANG, HongLiang; MARCHAND, Christophe. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. **Chemistry & Biology**, v. 17, p. 421-433, 2010.
- PONDUGULA, Satyanarayana *et al.* Cardioprotective Effects of *Oroxylum indicum* Extract Against Doxorubicin and Cyclophosphamide-Induced Cardiotoxicity. **Cardiovascular Toxicology**, v. 22, p. 67-77, 2022.
- RICCARDI, Carlo; NICOLETTI, Ildo. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1458-1461, 2006.
- SENTHILKUMAR, Subramanian; YOGEEETA, Surinder; SUBASHINI, Rajakannu; DEVAKI, Thiruvengadam. Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 252-260, 2006.
- SKEHAN, Philip *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107–1112, 1990.
- TACAR, Oktay; SRIAMORNSAK, Pornsak; DASS, Crispin. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, 157-170, 2013.
- THE NATIONAL CANCER INSTITUTE. Breast Cancer Treatment for health professionals (PDQ®) [Internet]. EUA. 2023. Disponível em:

<https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq>. Acesso em 19 mai. 2023.

TOMANKOVA, Katerina *et al.* 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.

WEI, Tian; XIAOJUN, Xie; PEILONG, Cao. Magnoflorine improves sensitivity to doxorubicin (DOX) of breast cancer cells via inducing apoptosis and autophagy through AKT/mTOR and p38 signaling pathways. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 121, p. 1-10, 2020.