

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS EM CULTIVO DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA: ENSAIO CLONOGÊNICO E OBTENÇÃO DA DOSE IC₅₀ DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Ana Paula Rodrigues Pinheiro¹; Patrícia Rayna Simas de Souza², Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria²

¹Centro Universitário do Norte

²Universidade Federal do Amazonas

E-mail do autor: anapaularodrigues15rp@gmail.com

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é uma espécie reativa de oxigênio que em determinadas concentrações ocasiona danos aos componentes celulares. Assim, esta molécula é utilizada como controle positivo em ensaios de citotoxicidade celular. O ensaio de clonogenicidade, por sua vez, avalia o potencial de uma única célula aderir, sobreviver, proliferar formando uma colônia visível. Neste sentido, nosso estudo teve por objetivo padronizar o ensaio clonogênico e obter o valor da concentração inibitória 50% (IC₅₀) do H₂O₂ nas linhagens tumorais da mama: MDA-MB-231 e MCF-7. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram plaqueadas e incubadas com as concentrações de 7,3; 1,51; 1,25; 1; 0,85; 0,43 e 0,25mM de H₂O₂ por 48 e 72 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. A viabilidade celular foi realizada através da metabolização do reagente MTT (2mg/ml) (brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H-tetrazólio). Para padronização do ensaio clonogênico, 400, 300, 200 e 100 células foram plaqueadas em cada poço de placas de 6 poços e mantidas em cultivo em meio completo por 10 dias. As colônias foram coradas em solução salina contendo 1% de cristal violeta e formaldeído 4% e contadas manualmente com o auxílio de uma lupa. Os dados foram obtidos pela realização de pelo menos três experimentos independentes expressos utilizando a média ± o erro padrão da média. As curvas de IC₅₀ foram analisadas pela curva de regressão não-linear, e para os dados de clonogenicidade, conduzida a análise de variância One-way ANOVA e teste de Bonferrone para a comparação das médias. Tais análises conduzidas no Software Graph Pad Prism 8. Os resultados demonstraram uma diminuição da viabilidade das células tumorais submetidas a altas concentrações de H₂O₂, sendo obtidos valores de IC₅₀ 1,239 mM para MDA-MB-231 e 1,237 mM para MCF-7 após 48 horas, e os valores de 0,946 mM para MDA-MB-231 e 0,9466 mM para MCF-7 em 72 horas. No ensaio de clonogenicidade, o plaqueamento de 300 células por poço apresentou a melhor distribuição de células e menor desvio padrão. Coletivamente, os resultados indicaram o número de célula para plaqueamento e definição do protocolo de clonogenicidade, assim como estabeleceram os valores de IC₅₀ de H₂O₂ nos tempos 48 e 72 horas para as duas linhagens tumorais estudadas. Tais valores de IC₅₀ serão utilizados como controle de positivos de morte celular em experimentos de viabilidade celular.

Palavra-chaves: Padronização. Peróxido de hidrogênio. Ensaio clonogênico.