



AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM 5-FLUOROURACIL E IRINOTECAN NO CÂNCER COLORRETAL

Lucas Umpierre Conter¹
Felipe Umpierre Conter²
Ivana Grivicich³

Resumo

O câncer colorretal é um dos tumores humanos mais frequentes e a terceira causa de morte relacionada ao câncer no mundo. Apesar de importantes progressos terapêuticos, os resultados na doença avançada ainda são muito modestos. Isto deve-se ao fato de que a droga mais utilizada nesta neoplasia, o antimetabólito 5-fluorouracil (5-FU), foi desenvolvido a mais de 40 anos produzindo taxas de respostas de somente 10-15%. Os efeitos anti-proliferativos do 5-FU e do Irinotecan (CPT-11) nas linhagens celulares foram avaliados após 24 h de exposição às drogas, seguido de 2 dias em meio de cultura sem drogas. A atividade catalítica da topoisomerase I revelou que a linhagem SNU-C4 apresenta 50% mais atividade desta enzima quando comparada com a HT-29. A atividade da carboxil esterase na linhagem SNU-C4 foi cerca de 2,5 vezes menor do que na linhagem HT-29.

Palavras-chaves: Topoisomerase; carboxil esterase; resistência; linhagem celular

INTRODUÇÃO

O Câncer Colorretal é a terceira causa de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa em países desenvolvidos, tendo esta neoplasia uma estimativa de 28 mil novos casos para o Brasil e de 141.210 novos casos para os Estados Unidos (AMERICAN CANCER SOCIETY HOMEPAGE, 2012). O CCR é uma neoplasia que afeta o intestino grosso e/ou reto, correspondendo a 9,4% de todos os cânceres da população mundial (INCA, 2012). A maior incidência do CCR geralmente é no sexo masculino (ZAVORAL et al., 2009; INCA, 2012), no entanto, no Brasil, este dado está se modificando, o número de novos casos previsto é de 14.180 para homens e de 15.960 para mulheres, correspondendo a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 16 para cada 100 mil mulheres. Segundo o INCA, aproximadamente 2,4 milhões de pessoas no mundo foram diagnosticadas com CCR (INCA, 2012). Com isso, a necessidade de investigação epidemiológica e estudos no sentido de direcionar ações investigativas, envolvendo medidas preventivas e estratégias de tratamento dessa doença.

O CCR resulta de um acúmulo de alterações moleculares que provoca uma alteração gradual na morfologia do tecido, iniciando com pólipos adenomatosos, seguido por displasias, o que acaba por conduzir ao desenvolvimento do carcinoma invasivo. Cerca de 5% dos pólipos adenomatosos tornam-se malignos dentro de um período de 10 anos (WINDER; LENZ, 2010). O CCR pode ser dividido em dois tipos, de acordo com a história familiar, o esporádico, que corresponde a 85% da neoplasia, e o hereditário, correspondente a 15% (LIMA et al., 2006).

¹ Aluno do Curso de Biomedicina da Universidade Luterana do Brasil - Bolsista FAPERGS – lconter@hotmail.com

² Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde da Universidade Luterana do Brasil – lipebtbf@gmail.com

³ Professora do Curso de Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde da Universidade Luterana do Brasil – grivicich@terra.com.br

Considerada uma das principais modalidades terapêuticas para as neoplasias colorretais, a quimioterapia sistêmica adjuvante é utilizada desde 1950, objetivando a melhora na sobrevida global do paciente, principalmente naqueles com CCR na fase III e em casos específicos na fase II (GOODWIN & ASMIS, 2009). O tratamento adjuvante inicialmente era constituído de um único antineoplásico, o 5-fluorouracil (5-FU), mas com o avanço nas pesquisas, modificou-se com a inclusão de outros agentes a fim de melhorar a resposta clínica do paciente e obter sinergismo na citotoxicidade e indução de apoptose (THANT et al., 2008). Além do 5-FU, foram aprovados pelo *Food & Drug Administration* (FDA) o uso de do irinotecano (CPT-11), leucovorina, capecitabina, oxaliplatina, cetuximabe, bevacizumabe e panitumumabe no tratamento de neoplasias de cólon e reto (GOODWIN & ASMIS, 2009; STEVENSON et al., 2011).

Muitos estudos têm sido realizados no intuito de avaliar a combinação do CPT-11/5-FU/LV quanto a sua eficácia terapêutica no carcinoma de cólon. Evidências *in vivo* e *in vitro* sugerem uma interação de citotoxicidade dependente da sequência de administração do 5-FU e CPT-11 (GRIVICICH et al., 2001). Em estudos pré-clínicos a utilização do 5-FU junto com o CPT-11 ou o SN-38 demonstrou efeito aditivo na citotoxicidade do 5-FU em linhagens celulares de cólon, leucemia e pâncreas (revisado em GRIVICICH et al., 2001). Em um estudo com seis linhagens celulares de cólon foi observado um sinergismo com a administração do SN-38 antes do 5-FU (PAVILLARD et al., 1998). Também foi descrito um sinergismo quando o 5-FU foi utilizado antes do CPT-11 ou do SN-38 em linhagens de cólon (GUICHARD et al., 1998), enquanto que em outro estudo a mesma sequência demonstrou ser antagônica. Com base nos efeitos sinérgicos obtidos em estudos pré-clínicos, além dos resultados como agentes isolados, distintos mecanismos de ação e resistência e uma sobreposição parcial de toxicidade, diferentes combinações com CPT-11 e 5-FU têm sido avaliadas (revisado em GRIVICICH et al., 2001).

Alteração na atividade da enzima topo I está relacionada à diminuição da capacidade do CPT-11 de introduzir quebras no DNA, sendo considerado o principal mecanismo de resistência a este agente (TAKIMOTO et al., 1997). Além disso, a enzima carboxil esterase (essencial para a conversão do CPT-11 no seu metabólito ativo SN-38) tem um papel importante na resposta ao tratamento com CPT-11. Recentemente, o inibidor da topoisomerase I irinotecan (CPT-11) demonstrou, em carcinoma de cólon avançado, respostas comparáveis tanto em pacientes não tratados quanto naqueles que tiveram recaída após terapia com 5-FU. Estes resultados justificam a avaliação da combinação 5-FU/CPT-11 nesta doença. Apesar das respostas dos estudos clínicos serem promissoras, a melhor sequência de administração destes agentes ainda não foi determinada.

Neste estudo, avaliamos a combinação CPT-11/5-FU quanto ao aumento da inibição do crescimento celular quando comparada com os agentes sozinhos nas linhagens celulares de carcinoma de cólon humano e o efeito nas atividades das enzimas topoisomerase I e carboxil esterase.

METODOLOGIA

Foram utilizadas as linhagens celulares de carcinoma de cólon humano HT-29 e SNU-C4 adquiridas da American Type Culture Collection (Rockville, MD, EUA). As células foram mantidas em frascos de cultura 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 CO₂ e umidade de no mínimo 95%.

Culturas em triplicatas foram expostas ao 5-FU, CPT-11, ou a ambos em diversas sequências. As respostas celulares foram avaliadas através da coloração com sulforodamina B (SRB) (SCUDIERO et al., 1988). O SRB ligado é proporcional a densidade celular e foi determinado através das absorbâncias medidas em um comprimento de onda de 515 nm

usando um leitor de microplacas (Modelo 750, Cambridge Technology, Inc., Watertow, MA, EUA). O perfil de dose-resposta foi plotado, e deste, derivado os valores de IC_{20} , IC_{50} e IC_{80} , isto é, a concentração de droga necessária para inibir 20%, 50% e 80% do crescimento celular, respectivamente, quando comparada aos controles não tratados.

A atividade catalítica da topoisomerase I foi determinada através da capacidade da enzima, presente nos extratos nucleares, converter o DNA superenrolado em DNA relaxado (TRASK & MILLER, 1983). A conversão do DNA superenrolado em DNA relaxado pela topoisomerase I foi realizada usando um Kit para determinação de Topoisomerase I (Topoisomerase I Assay Kit; TopoGEN, Columbus, OH, EUA), conforme instruções do fabricante. Após a separação do DNA superenrolado e DNA relaxado os géis foram fotografadas e os níveis da enzima foram medidos em relação a intensidade das bandas encontradas no gel. Os negativos foram usados para quantificar a intensidade das bandas em software Optiquant (Versão 02.00, Packard Instrument Co, 1997) e expressas em unidades arbitrárias.

As atividades da enzima carboxil esterase foram determinadas na fração microsossomal das células através da conversão do acetato de para-nitrofenil no seu metabólito para-nitrofenol (HEYMANN & MENTLEIN, 1981). Inicialmente realizamos a separação da fração microsossomal, que foi a seguir utilizada para quantificação da enzima. A seguir, sobrenadantes contendo a enzima foram alíquotados e utilizados para determinação da atividade da enzima e quantificação de proteína (BRADFORD, 1978). Aproximadamente 12,5 μ g do extrato microsossomal foi misturado com acetato de para-nitrofenil 1 mM e Tris-HCl 100 mM pH 8.2, em volume final de 1 mL. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Lambda Bio, Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT, EUA) em comprimento de onda de 405 nm, durante 2 min para detectar a formação do para-nitrofenol. As atividades da enzima foram expressas em mU/mg proteína.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos citotóxicos do 5-FU e do CPT-11 nas linhagens celulares foram avaliados após 24 h de exposição às drogas, seguido de 2 dias em meio de cultura sem drogas. Os valores de IC_{50} a linhagem HT-29 é resistente ao 5-FU (valores de IC_{50} 8,2 μ M), enquanto que a linhagem SNU-C4 apresentou uma maior sensibilidade a esta droga (valor de IC_{50} de 2,2 μ M). As duas linhagens apresentaram pequenas diferenças na sua sensibilidade ao CPT-11, com valores de IC_{50} de 2,5 e 3,8 μ M, respectivamente.

A seguir, examinamos os efeitos de um dos agentes em uma concentração fixa e de baixa toxicidade na inibição do crescimento celular induzido pelo outro, em diferentes combinações e sequências. O pré-tratamento com CPT-11 aumenta a inibição do crescimento causada pelo 5-FU em cerca de 4 e 2 vezes nas linhagens HT-29 e SNU-C4, respectivamente. Por outro lado, o pré-tratamento com IC_{20} do 5-FU diminui a inibição do crescimento induzida pelo CPT-11 em 2 e 4 vezes nas linhagens HT-29 e SNU-C4, respectivamente. Nenhum dos tratamentos com os agentes simultaneamente por 24 h alterou significativamente a inibição do crescimento celular causada pelas drogas sozinhas na linhagem HT-29. Por outro lado, na linhagem SNU-C4, a exposição simultânea a IC_{20} do CPT-11 e 5-FU diminui o efeito deste último em cerca de 2 vezes, enquanto que o tratamento concomitante com IC_{20} 5-FU levou a um aumento da citotoxicidade do CPT-11 também em 2 vezes.

Para verificar o quanto a topoisomerase I estava envolvida nas diferentes respostas celulares ao CPT-11, a sua atividade catalítica foi determinada em extratos nucleares através da conversão do DNA superenrolado em DNA relaxado. Os DNAs foram separados em gel de agarose, e as intensidades das bandas foram quantificadas. Esta análise revelou valores de 1 e 1,5 unidades arbitrárias, para as linhagens HT-29 e SNU-C4, respectivamente. Estes

resultados indicam que a linhagem SNU-C4 apresenta 50% mais atividade desta enzima quando comparada com a HT-29.

Como a atividade da topoisomerase I não esclareceu completamente as respostas celulares ao CPT-11, avaliamos o envolvimento da ativação intracelular deste agente medindo a atividade da carboxil esterase em extratos microsossomais. A atividade da carboxil esterase na linhagem SNU-C4 foi cerca de 2,5 vezes menor do que na linhagem HT-29. Ou seja, as linhagem celular HT-29 apresentou uma maior capacidade de conversão do CPT-11 em SN-38, quando comparadas com a linhagem SNU-C4.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A linhagem HT-29 é resistente ao 5-FU, enquanto que a linhagem SNU-C4 apresentou uma maior sensibilidade a esta droga.

As duas linhagens apresentaram pequenas diferenças na sua sensibilidade ao CPT-11. O pré-tratamento com CPT-11 aumenta a inibição do crescimento causada pelo 5-FU em cerca de 4 e 2 vezes nas linhagens HT-29 e SNU-C4, respectivamente. Por outro lado, o pré-tratamento com 5-FU diminui a inibição do crescimento induzida pelo CPT-11 em 2 e 4 vezes nas linhagens HT-29 e SNU-C4, respectivamente.

Nenhum dos tratamentos com os agentes simultaneamente por alterou significativamente a inibição do crescimento celular causada pelas drogas sozinhas na linhagem HT-29. Por outro lado, na linhagem SNU-C4, a exposição simultânea do CPT-11 e 5-FU diminui o efeito deste último em cerca de 2 vezes, enquanto que o tratamento concomitante com 5-FU levou a um aumento da citotoxicidade do CPT-11 também em 2 vezes.

A atividade catalítica da topoisomerase I revelou que a linhagem SNU-C4 apresenta 50% mais atividade desta enzima quando comparada com a HT-29.

A atividade da carboxil esterase na linhagem SNU-C4 foi cerca de 2,5 vezes menor do que na linhagem HT-29.

Nossos resultados sugerem que a sensibilidade ao CPT-11 foi determinada por um equilíbrio entre as atividades da topoisomerase I e carboxiel esterase.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY HOMEPAGE. **Statistics for 2004**. Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0.asp> Acesso em: dezembro de 2012.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1978.

GOODWIN, R.; ASMIS, T.R. Overview of Systemic Therapy for Colorectal Cancer. **Clin Colon Rectal Surg.**, v. 22, p. 251-256, 2009.

GRIVICICH, I. et al. Irinotecan And Oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. **Braz J Med Biol Res.**, v. 34, n. 9, p. 1087-1103, 2001.

GUICHARD, S. et al. Cellular interactions of 5-fluorouracil and the camptothecin analogue CPT-11 (irinotecan) in a human colorectal carcinoma cell line. **Biochem Pharmacol.**, v. 1, n.55, p. 667-676, 1998.

HEYMANN, E.; MENTLEIN R. Carboxylesterases-amidases. **Methods Enzymol.**, v. 77, p. 333-344, 1981.

INSITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em:<<http://www.inca.org.br>> Acesso em: 12 de julho de 2015.

LIMA, J. et al . Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. **Arq. Gastroenterol.** v. 43, n. 1, p. 8-13, 2006.

PAVILLARD, V. et al. Combination of irinotecan (CPT11) and 5-fluorouracil with an analysis of cellular determinants of drug activity. **Biochem Pharmacol.**, v. 15, n. 56, p. 1315-1322, 1998.

SCUDIERO, D. et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Res.**, v. 48, p. 4827-4833, 1988.

STEVENSON, L. et al. Calbindin 2 (CALB2) Regulates 5-Fluorouracil Sensitivity in Colorectal Cancer by Modulating the Intrinsic Apoptotic Pathway. **Plos One.**, v. 6, p. 1-11, 2011.

TAKIMOTO, C. et al. DNA topoisomerase I inhibitors. **Cancer Chemother Biol Response Modif.** , v. 17, p. 80-113, 1997.

THANT, A. et al. Role of caspases in 5-FU and selenium-induced growth inhibition of colorectal cancer cells. **Anticancer Res.**, v. 28, p. 3579-3592, 2008.

TRASK, D.; MULLER, M. Biochemical characterization of topoisomerase I purified from avian erythrocytes. **Nucleic Acids Res.**, v. 11, n. 11, p. 2779-2800, 1983.

VIEIRA, F; SENA, V. Câncer colorretal metastático: papel atual dos anticorpos monoclonais e a individualização de seu uso. **Arq Bras Cir Dig.**, v. 22, p. 45-49, 2009.

WINDER, T; LENZ, H. Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. **Cancer Treat Rev.**, v. 36, p. 550-556, 2010.

ZAVORAL, M. et al. Colorectal cancer screening in Europe. **World J Gastroenterol.**, v. 15, p. 5907-5915, 2009.