



EFEITO GEMCITABINA EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE CÓLON HUMANO

Gabrielle Cosme Coelho¹
Maicon Zanandrea²
Ivana Grivicich³

Resumo

O câncer de cólon é a terceira neoplasia mais prevalente no mundo, e a quarta causa de morte por câncer. Neste sentido, muitos estudos têm sido realizados na busca de novas formas terapêuticas para esta patologia. Neste estudo nós avaliamos a capacidade da gemcitabina em sensibilizar linhagens celulares de carcinoma de cólon humano e seu efeito sobre o ciclo celular. Para isso, as linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW-620, HT-29 e SNU-C4 foram expostas à gemcitabina. Foi avaliado o efeito citotóxico pelos ensaios de sulforodamina B e distribuição das células no ciclo celular. As linhagens Sw-620 e HT-29 se mostraram mais resistentes (IC_{50} de $13\mu M$ e $10\mu M$, respectivamente) em comparação à linhagem SNU-C4 ($3,5\mu M$). A fim de determinar a inibição da proliferação celular nas linhagens celulares, avaliamos a distribuição do ciclo celular após 72 h de exposição ao tratamento. Com isso, observamos uma parada expressiva na fase S do ciclo celular em linhagens expostas a Gemcitabina, quando comparadas a células não tratadas. Em síntese nossos achados demonstram que a gemcitabina possui maior efeito na linhagem celular SNU-C4, em relação a outras linhagens celulares derivados de câncer de cólon humano que estudamos e sugere que a gemcitabina esteja associada a capacidade de sincronizar as células na fase S do ciclo celular

Palavras-chave: SNU-C4; ciclo celular; neoplasia

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é a terceira neoplasia maligna mais comum mundialmente (FERLAY et al., 2014). Nos últimos 10 anos, o índice de mortalidade para câncer colorretal caiu cerca de 3%, e grande parte dessa queda ocorreu em adultos com idades de 65 anos e

1 Aluno do colégio Cristo Redentor – Bolsista PIBIC-EM/CNPq – gabicosme.coelho@gmail.com

2 Acadêmico do PPGBIOSAÚDE – maiconzzz@yahoo.com.br

3 Professora do PPGBIOSAÚDE e PPGGTA – grivicich@ulbra.br

mais velhos (SIEGEL et al., 2015). Esse declínio pode ser atribuído ao aumento nos testes de rastreamento o qual detecta e permite a remoção de pólipos pré-cancerígenos (ZAUBER, 2015). Em contrapartida, os índices aumentaram durante esse mesmo período, entre adultos com menos de 50 anos de idade (SIEGEL et al., 2015). No Brasil, esse tipo de câncer ocupa o terceiro lugar entre outras incidências neoplásicas e é a terceira causa de morte por câncer no país (INCA, 2014). De uma forma geral, a idade mais afetada permeia dos 40 aos 70 anos. As condições associadas ao risco de desenvolvimento do câncer colorretal inclui histórico pessoal de câncer colorretal ou pólipos adenomatosos, histórico pessoal de doenças intestinais (Colite Ulcerativa ou doença de Crohn), um histórico familiar de câncer colorretal ou pólipos, um histórico familiar de síndrome de câncer colorretal hereditária como polipose adenomatosa familiar (PAF) ou câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) (EDWARDS et al., 2010). A maior parte dos cânceres colorretais deriva de pólipos adenomatosos, que geralmente são assintomáticos e evoluem em um processo longo e silencioso conhecido como carcinogênese. Vale ressaltar a importância de prevenção primária. Assim, o exame preventivo de rotina para pessoas acima de 50 anos deve ser feito com colonoscopia, o que reduz o risco de morte por câncer colorretal em 90%. Ainda mais, a maioria dos tumores colorretais são completamente curáveis quando diagnosticados em estágios iniciais (EDWARDS et al., 2010).

A terapia de primeira linha consiste na ressecção cirúrgica total do tumor e de linfonodos adjacentes, associado concomitante pré-operatório ou pós-operatório com radioterapia ou com a quimioterapia, a fim de diminuir a possibilidade de recidivas. Embora uma pequena percentagem revela-se incurável, o prognóstico torna-se extremamente pobre em estágios mais avançados (FERLAY et al., 2014). Assim, é de se notar que, embora a quimioterapia mostre avanços significativos no tratamento da doença em fase metastática, as respostas ainda não são satisfatórias. Estes resultados justificam a avaliação de novas estratégias para o tratamento da neoplasia (KIM, 2015). Gemcitabina (2', 2'-difluorodesoxicidina, dFdC, Gemzar), é um nucleosídeo citotóxico análogo ao desoxicidina trifosfato dFdCTP, que se incorpora no DNA e, subsequentemente, inibe a atividade de reparação do DNA e de exonuclease. É um quimioterápico de amplo espectro de atividade que é amplamente utilizado, quer como agente único ou em combinação com outros quimioterápicos (BURRIS et al., 1997). De acordo com estudos, a eficácia da inibição do crescimento de neoplasia humana obtida numa variedade de tumores sólidos, tanto *in vitro* e *in vivo*, também foi confirmada com sucesso (SHEWACH et al., 1994; PAUWELS et al., 2006). A gemcitabina atualmente é indicada como um agente único no tratamento de

pacientes com câncer pancreático metastático e na combinação de medicamentos de quimioterapia no câncer de pulmão de não pequenas células, câncer da bexiga, câncer da mama, e sarcoma de tecido mole (HERTEL et al., 1990; SHEWACH et al., 1994; BURRIS et al., 1997; OSTRUSZKA et al., 2000; PAUWELS et al., 2006). Vários estudos tentaram elucidar os mecanismos de ação que estão concentrados na redistribuição do ciclo celular, a indução de apoptose, o papel da p53, a modulação do metabolismo de desoxinucleosídeos (MINI et al., 2006), e danos no DNA (HERTEL et al., 1990). Neste estudo, nós investigamos o potencial de sensibilização da gemcitabina e redistribuição do ciclo celular em linhas celulares de câncer de intestino.

METODOLOGIA

CULTIVO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES

As Linhagens de carcinoma colorretal HT 29 e SW 620 foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD, EUA). A linhagem celular de câncer do cólon humano SNU-C4 foi gentilmente cedida pelo Dr. G.J. Peters (Free University Hospital, Amsterdã e Holanda). As células foram mantidas em meio completo constituído por meio RPMI-1640 (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), contendo 2 % (w/v) de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 10 % (v/v) de soro fetal bovino (Invitrogen, São Paulo, SP), mantidos a uma temperatura de 37 °C, umidade relativa mínima de 95 %, e uma atmosfera de 5 % de CO₂.

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

As células (1×10^4) foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas no dia seguinte com concentrações variadas de gemcitabina (0 a 100 µM) durante 24 h. A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio sulforodamina B (SRB, Sigma-Aldrich) (Skehan et al., 1990) que envolvem fixação *in situ* com ácido tricloroacético (TCA; Sigma-Aldrich), a coloração com SRB, e solubilização de SRB ligado às células com uma base de Trizma (Sigma-Aldrich). Esta última foi avaliada por colorimetria com um Modelo EX leitor de microplacas Multiskan (Labsystems, EUA). As absorvâncias foram lidas a um comprimento de onda de 540 nm. Três experiências independentes foram efetuadas para cada tratamento. As concentrações de gemcitabina que resultaram na inibição de 50 % de crescimento (IC₅₀) quando comparada com os controles foram calculadas a partir de uma curva de dose-resposta semi logarítmica por interpolação linear.

ANALISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a avaliação do ciclo celular, 5×10^5 células foram tratadas com gemcitabina (IC_{50} ; 24 h). Após os tratamentos, as células foram colhidas e fixadas em etanol 70 %. As amostras foram lavadas em PBS, ressuspensas em 0,5 ml de PBS e incubaram-se com RNase A 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de iodeto de propídio e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 20 min na obscuridade à temperatura ambiente (NICOLETTI et al., 1991). 20.000 células foram analisadas no citometro de fluxo FACS Calibur (Becton-Dickinson, San José, CA, EUA). O conteúdo do DNA foi analisado utilizando um software ModFit 2.0.

ANALISE ESTATÍSTICA

Todas as experiências foram realizadas em triplicatas. Quando apropriado, foi aplicada pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o programa GraphPad InStat (versão 3.05; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas com valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O carcinoma de cólon é um dos tumores humanos mais frequentes e a terceira causa de mortalidade relacionada ao câncer no mundo (HAGGAR et al., 2009). Embora, a quimioterapia venha apresentando significativos avanços no tratamento da doença metastática, as respostas ainda são insatisfatórias. Estes resultados justificam a avaliação de novas estratégias no tratamento desta neoplasia (DUNNE et al., 2003). A gemcitabina tem sua eficácia evidenciada contra diversos tumores sólidos (PAUWELS et al., 2006; EDWARDS et al., 2010). Neste estudo nós avaliamos se o efeito citotóxico da gemcitabina em linhagens celulares de carcinoma de cólon humano e seu efeito sobre o ciclo celular.

A sensibilidade das linhagens celulares de cancer colorretal SW620, HT- 29 e SNU - C4 à gemcitabina foi analisada primeiro a fim de determinar quais doses são ideais para estudos posteriores. A Tabela 1 mostra que SW620 e células HT-29 são mais resistentes a gemcitabina (valores de IC_{50} de 13 μM e 10 μM , respectivamente), no entanto a linhagem SNU-C4 apresentou maior sensibilidade para este quimioterapico (valores de IC_{50} de 3,5 μM) (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de IC₅₀ (μM; média ± desvio padrão, n = 6) em linhagens celulares de cancer colorretal humano SW620, HT-29 and SNU-C4 após 24h de tratamento com gemcitabina

| Linhagem Celular | Dose Gemcitabina (μM) |
|------------------|-----------------------|
| | IC ₅₀ |
| SW-20 | 13,0 ± 2,4 |
| HT-29 | 10,0 ± 1,3 |
| SNU-C4 | 3,5 ± 0,9 |

Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram uma inibição no crescimento celular em linhagens de câncer humano (incluindo a HT-29) com doses variando de 1,1 a 10,7 μM de gemcitabina após 24 h de tratamento (SHEWACH et al., 1994).

Para determinar se a inibição da proliferação celular correlacionou-se com diferenças na resposta do ciclo celular para a gemcitabina, analisou-se a distribuição do ciclo celular após 72 h (Tabela 2). Em geral, as células não tratadas demonstraram diferenças na distribuição do ciclo celular. A linhagem de células SNU-C4 não demonstrou diferença quando comparado com o controle (Tabela 2). Tal como representado na Tabela 2, as células tratadas com gemcitabina isolada induziu uma forte parada do ciclo celular na fase S (p <0,05) quando comparado com células não tratadas em todas as linhas celulares.

Tabela 2: Efeito da Gemcitabina (IC₅₀) na distribuição do ciclo celular de linhagem celular de câncer colorretal humano sw620, SNU-C4 e HT-20. Os dados foram apresentados com média ± desvio padrão do percentual de células em três experimentos independentes.

| Tratamento | SW-620 | | | HT-29 | | | SNU-C4 | | |
|------------------------------|-------------|-----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | G0/G1 | S | G2/M | G0/G1 | S | G2/M | G0/G1 | S | G2/M |
| Controle | 7,2 ± 6,5 | 21,5±3,9 | 2,9±2,8 | 83,3± 8,9 | 6,2 ± 1,6 | 10,5± 2,4 | 60,1± 5,2 | 24,2± 2,9 | 16,3± 2,4 |
| Gemcitabina IC ₅₀ | 45,5 ± 2,5* | 41,0±2,9* | 0,6±1,7 | 56,3±4,1* | 31,4±3,5* | 13,1± 2,3 | 50,2± 4,8 | 43,0±5,2* | 7,6 ± 2,9* |

* Diferente de controle não tratado (p < 0,05),

Os mecanismos de ação da gemcitabina incluem a inibição da síntese de DNA e indução da apoptose. O dFdCTP é incorporado ao DNA, inibindo a polimerase por competição, interferindo na enzima ribonucleotídeo redutase, causando depleção do deoxinucleotídeo trifosfato necessário para síntese do DNA, ou seja, inibindo a formação deste. Em linha com nossos achados, diversos estudos relatam que o efeito da gemcitabina é dependente da fase do ciclo celular (CAPPELLA et al., 2001)

CONCLUSÕES

Descobrimos que, em resposta ao tratamento com gemcitabina, todas as linhagens celulares demonstraram uma inibição dose-dependente na proliferação celular. Além disso, a linhagem SNU-C4 foi considerada, após a exposição ao fármaco, a linhagem celular mais sensível à gemcitabina. Isso se deve a capacidade da gemcitabina em incorporar o DNA e inibir a ação da polimerase, interferindo com a enzima ribonucleotideo redutase, causando a depleção de desoxinucleotideos-trifosfatos necessários para a síntese de DNA.

REFERÊNCIAS

- BURRIS, H.A. 3RD., MOORE, M.J., ANDERSEN, J., et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. **J Clin Oncol**, v. 15, p. 2403-2413, 1997.
- CAPPELLA, P., TOMASONI, D., FARETTA, M., et al. Cell cycle effects of gemcitabine. **Int J Cancer**, v. 93, p. 401-408, 2001.
- DUNNE, A.L., PRICE, M.E., MOTHERSILL, C., et al. Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells. **Br J Cancer**, v. 89, p. 2277-2283, 2003.
- EDWARDS, B.K., WARD, E., KOHLER, B.A., et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. **Cancer**, v. 116, p. 544-573, 2010.
- HAGGAR, F.A., BOUSHEY, R. P. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. **Clin Colon Rectal Surg**, v. 22, p. 191-197, 2009.
- HERTEL, L.W., BODER, G.B., KROIN, J.S., et al. Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). **Cancer Res**, v. 50, p. 4417-4422, 1990.
- Instituto Nacional de Câncer. Estimativa. Incidência de câncer no Brasil. 2015.
- KIM, J.H. Chemotherapy for colorectal cancer in the elderly. **World J Gastroenterol**, v. 21, p. 5158-5166, 2015.
- MINI, E., NOBILI, S., CACIAGLI, B., et al. Cellular pharmacology of gemcitabine. **Ann Oncol**, v. 17, p. 7-12, 2006.

NICOLETTI, I., MIGLIORATI, G., PAGLIACCI, M.C., et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 139, p. 271-279, 1991.

OSTRUSZKA, L.J., SHEWACH, D.S. The role of cell cycle progression in radiosensitization by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine. **Cancer Res**, v. 60, p 6080-6088, 2000.

PAUWELS, B., KORS, A.E., PATTYN, G.G., et al. The relation between deoxycytidine kinase activity and the radiosensitising effect of gemcitabine in eight different human tumour cell lines. **BMC Cancer**, v. 6, p.142, 2006.

SHEWACH, D.S., HAHN, T.M., Chang sensitization of human colon carcinoma cells. **Cancer Res**, v. 54, p. 3218-3223, 1994.

SIEGEL, R., DESANTIS, C., JEMAL, A., et al. Colorectal cancer statistics 2014. **CA Cancer J Clin**, v. 6, p. 104-117, 2014.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J Natl Cancer Inst**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

ZAUBER, A.G. The impact of screening on colorectal cancer mortality and incidence: has it really made a difference? **Dig Dis Sci**, v. 60, p. 681-691, 2015.