



MODULAÇÃO DO EFEITO DO 5-FLUOROURACIL PELO CELECOXIBE NA LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE CARCINOMA COLORRETAL HUMANO

Gabriela J. V. Amado¹; Felipe Umpierre Conter²; Ivana Grivicich³

1. Aluna do curso de graduação de Medicina – bolsista Fapergs – gabivasques@gmail.com; 2. Aluno de doutorado do PPGBIOSAUDE – lipebtbf@gmail.com; 3. Professora do PPGBIOSAUDE – grivicich@terra.com.br

Introdução

O Câncer Colorretal (CCR) é um dos cânceres que mais acomete a população mundial. A história natural do CCR pode determinar formas de prevenção e detecção precoce, uma vez que esta doença comumente se desenvolve lentamente por muitos anos; morbidade e mortalidade podem ser reduzidas através de programas de rastreamento da doença. Os Tumores colorretais localizados são passíveis de serem tratados através da ressecção cirúrgica, apresentado um potencial curativo. Já pacientes com doença metastática micro e macroscopicamente, a melhor abordagem terapêutica passa a ser a terapia sistêmica, sendo a quimioterapia o método mais amplamente utilizado em pacientes com CCR. Inicialmente, o único agente utilizado para o tratamento do CCR metastático foi o 5-Fluorouracil (5-FU), um fármaco representante da família das Fluoropirimidinas. Posteriormente, foram introduzidos em associação dois agentes com potente ação citotóxica: o Irinotecam – um inibidor da topoisomerase I – e a Oxaliplatina - derivada da platina. O grupo de pacientes que apresentam progressão da doença mesmo após a terapêutica inicial com os protocolos não tem outra alternativa de tratamento para ser considerada a não ser tentativa de outro esquema com as mesmas drogas, tornando-se em pacientes resistentes à terapêutica proposta. A busca de medicamentos que auxiliem na resposta terapêutica adquire destaque. A ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma enzima que tem recebido atenção. Observou-se que em múltiplos ensaios – *in vitro*, *in vivo*, observacionais e clínico – que a inibição seletiva de COX-2 reduz produção de prostaglandinas e o risco de diversas neoplasias, dentre as quais o CCR. Entre os inibidores da COX-2, o mais estudado é o Celecoxibe (CLX).

Desta forma, o presente trabalho visa avaliar o efeito dos fármacos 5-FU e CLX sobre a linhagem celular de carcinoma de cólon humano HT-29, objetivando detectar uma possível interação entre esses fármacos que promova melhora da resposta ao tratamento ao aumentar a taxa de morte celular.

Metodologia

A linhagem celular de carcinoma colorretal humano HT-29 foi exposta a: 1) doses seriadas de 5-FU (2, 5, 10, 20, 40, 50, 100 µM) ou CLX (5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 µM) por 48 h.; 2) pré-tratamento com IC₅₀ CLX por 24 h seguido de IC₅₀ do 5-FU por 24 h.

A avaliação de morte e viabilidade celular foi realizada pelos ensaios colorimétricos de Sulforodamida B (SRB) e MTT ((3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide).

A expressão genes *BECN1*, *BIRC5* e *PTGS2* foi realizada utilizando método de PCR Real-Time.

A análise estatística foi feita pela análise de variância (one-way ANOVA) seguido de Student-Newman-Keuls, com valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

Efeito citotóxico do 5-FU e CLX Isolados e Combinados nas Células Cultivadas:

O pré-tratamento com IC₅₀ do Celecoxibe por 24 h, aumentou a sensibilidade ao 5-Fluorouracil em aproximadamente 1,5 vezes, promovendo aumento da morte celular (Tabela 1).

Também o pré-tratamento levou a uma redução significativa de células viáveis quando comparado com o 5-FU como agente único (Figura 1).

Tabela 1. Valores de IC₅₀ (µM; média ± DP, n = 3) na linhagem celular de carcinoma de cólon humano HT-29 após tratamento por 48 h com 5-fluorouracil ou Celecoxibe. As respostas celulares foram avaliadas através da coloração com SRB.

	HT-29 (µM)
5-Fluorouracil	8,5 ± 1,3
Celecoxibe	15,2 ± 3,0*
Celecoxibe IC ₅₀ 24 h/5-Fluorouracil 24 h	5,2 ± 0,6*

*Significativamente diferente de 5-FU isolado (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls; $p < 0,001$).

Um estudo recente corrobora com tais hipótese, uma vez que observou-se redução maior do crescimento da massa tumoral enxada no subcutâneo de ratos quando receberam a combinação de 5-FU+CLX quando comparado aos ratos que receberam a terapêutica isolada.

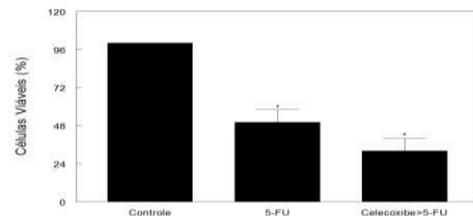


Figura 1. Viabilidade celular na linhagem celular de carcinoma colorretal humano HT-29 após tratamento por 48 h com IC₅₀ do 5-fluorouracil ou com IC₅₀ Celecoxibe por 24 h seguido de IC₅₀ do 5-fluorouracil por 24 h. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). *Significativamente diferente de 5-FU isolado (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls; $p < 0,001$).

Efeito do 5-FU e CLX, isolados em combinados sobre a expressão gênica (Tabela 2):

Tratamento isolado com IC₅₀ do Celecoxibe não foi possível detectar o gene da Ciclooxigenase-2 (*PTGS2*). Isto era esperado, visto que este fármaco pode inibir a expressão da ciclooxigenase-2.

Redução significativa na expressão do *BIRC5* no tratamento combinado CLX + 5-FU, quando comparado ao tratamento isolado com 5-FU.

Aumento significativo na expressão do *BECN1*, gene associado com atividade autofágica, no tratamento isolado com 5-FU.

Tabela 2. Expressão dos genes *PTGS2*, *BIRC5* e *BECN1* após tratamento com Celecoxibe (IC₅₀), 5-fluorouracil (IC₅₀), ou pré-tratamento por 24 h com Celecoxibe (IC₅₀) seguido de 24 h de 5-fluorouracil (IC₅₀)

Gene	Tratamento	Concentração Relativa
<i>PTGS2</i>	Celecoxibe	Não detectável
	5-fluorouracil	3,66 ± 2,13
	Celecoxibe/5-fluorouracil	1,49 ± 0,48*
<i>BIRC5</i>	Celecoxibe	0,94 ± 0,96
	5-fluorouracil	2,40 ± 0,29*
	Celecoxibe/5-fluorouracil	1,18 ± 0,13
<i>BECN1</i>	Celecoxibe	0,70 ± 0,07
	5-fluorouracil	1,70 ± 0,29*
	Celecoxibe/5-fluorouracil	0,42 ± 0,18*

*Diferente do controle (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Conclusão

- Sinergismo entre Celecoxibe e 5-Fluorouracil no tratamento do carcinoma colorretal humano.
- Aumento da morte celular decorrente de uma maior citotoxicidade induzidas por essas substâncias.
- Alterações na expressão de genes associados com apoptose e autofagia.
- Perspectiva realizar um estudo da morfologia celular para observar os acontecimentos que estão envolvidos nesse processo de auto-renovação celular.